DIE PERFUNDIERTE RATTENLEBER ALS CHOLESTASEMODELL: VERGLEICH DER INTRAHEPATISCHEN CHOLESTASE NACH α-NAPHTHYLISOTHIOCYANAT (ANIT)-BEHANDLUNG UND DURCH CALCIUMENTZUG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hartmut Höke
aus Engershausen

1980

DIE PERFUNDIERTE RATTENLEBER ALS CHOLESTASEMODELL: VERGLEICH DER INTRAHEPATISCHEN CHOLESTASE NACH α-NAPHTHYLISOTHIOCYANAT (ANIT)-BEHANDLUNG UND DURCH CALCIUMENTZUG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hartmut Höke
aus Engershausen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	2. April 1980
Dekan:	Prof. Dr. M. Hanack
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Pfaff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke

Die vorliegende Dissertation wurde von Februar 1978 bis März 1980 am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. Remmer) unter Anleitung von Prof. Dr. E. Pfaff durchgeführt.

Herrn Dr. E. Pfaff danke ich sehr für seine großzügige Unterstützung in der Durchführung dieser Arbeit und für zahlreiche anregende Diskussionen, Herrn Dr. H. Krell für seine ständige Gesprächsbereitschaft und richtungsweisenden Ratschläge. Frau S. Kasperek bin ich für ihre vielen technischen Hilfeleistungen zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. H. Sies (Inst. für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie, Universität München) und Herrn Dr. A. Wendel (Inst. für Physiologische Chemie, Universität Tübingen) möchte ich danken für ihre technische Unterstützung bei der Messung von oxidiertem Glutathion.

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden bereits veröffentlicht:

KRELL, H.; HÖKE, H.; PFAFF, E.: Studies on the dependence of bile flow on extracellular calcium. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297, Suppl. R42 (1977)

KRELL, H.; HÖKE, H.; PFAFF, E.: Persisting changes in organic anion permeability after calcium-free intervals in liver perfusion. 12. FEBS Meeting, Dresden, Abstr.-Nr. 1382 (1978)

HÖKE, H.; KRELL, H.; PFAFF, E.: Are findings with isolated rat livers after short calcium free perfusion relevant for isolated cells? Arch. Toxicol. 44, 23-30 (1980)

KRELL, H.; HÖKE, H.; PFAFF, E.; METZ, J.: Development of intrahepatic cholestasis induced by α-naphthylisothiocyanate: increased permeability of tight junctions. FALK Symposium 27 (Leberkongreß), Basel: Communications of Liver Cells, Posterabstr. 36 (1979)

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1.	Substanzen	3
2.2.	Perfusionstechnik	3
2.3.	Versuchsanordnungen	5
2.3.1.	Durchführung der ANIT-Experimente unter 3.1.	5
2.3.2.	Versuchsdurchführung bei Calciumsenkung unter 3.2.	5
2.4.	Synthese von BSP·SG	6
2.5.	Messung von TCH	6
2.6.	Messung von BSP und BSP·SG	6
2.7.	Trennung von BSP und BSP·SG	7
2.7.1.	Verfahren	7
2.7.2.	Durchführung	7
2.7.3.	Berechnung der Konzentrationen	9
2.7.4.	Trennung von BSP und BSP·SG in der Galle	9
2.8.	Dünnschichtchromatographische Trennung der BSP-Metabolite in der Galle	10
2.9.	Radioaktivitätszählung	10
2.10.	Bestimmung von Glutathion (GSH)	11
2.10.1.	Aufarbeitung der Proben	11
2.10.2.	Gesamtglutathionbestimmung	11
2.10.3.	GSSG-Bestimmung	12
3.	ERGEBNISSE	13
3.1.	Die ANIT-induzierte Cholestase	13
3.1.1.	ANIT-Wirkungen	13
3.1.2.	Zeitliche Entwicklung der Sekretionsparameter und morphologische Veränderungen nach ANIT-Gabe	16

Seite

3.1.2.1. Gallenfluß 16

3.1.2.2. Maximale Sekretionsraten und Gleichgewichtskonzentrationen im Perfusat 17

3.1.2.3. Permeabilität von extrazellulären Markersubstanzen, ^{14}C-Sucrose und ^{32}P-Orthophosphat, in die Galle 18

3.1.2.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung 19

3.1.2.5. Schlußfolgerung 19

3.2. Die Wirkung von vorübergehendem Calciumentzug und kurzzeitiger Calciumsenkung auf die Sekretion 20

3.2.1. Umschalten auf calciumfreies Medium 20

3.2.2. Senkung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 0,05 mM 22

3.2.3. Senkung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 0,1 mM 23

3.2.4. Calciumentzug nach ANIT-Behandlung: Addition von ANIT- und Calciummangeleffekt 24

3.2.5. Abgabe einer nicht gallengängigen Substanz (Glutathion) ins Perfusat nach Calciumentzug 25

3.2.6. Schlußfolgerung 27

3.3. Untersuchungen im Fließgleichgewicht von steigender Infusion und Abgabe von BSP·SG bei Calciumentzug und nach ANIT-Vorbehandlung 27

3.3.1. Spezielle Versuchsbedingungen und Auswertungsmethoden 27

3.3.1.1. Analyse eines Radioaktivitätspulses 29

3.3.1.2. Meßbare und errechenbare Größen 30

3.3.1.3. Fließgleichgewichtsbedingungen 31

3.3.2. Überblick über Aufnahme- und Abgabeparameter 31

3.3.2.1. Gegenüberstellungen der Parameter nach Calciumentzug und ANIT-Vorbehandlung 31

3.3.2.2. Die Aufnahme unter Calciumentzug und nach ANIT-Behandlung 34

Seite

3.3.2.2.1. Erläuterungen zur Bedeutung eines Rückflusses 35

3.3.2.2.2. Aufnahmehemmung 36

3.3.2.3. Leberbindung von BSP·SG 38

3.3.2.3.1. Beeinflussung durch Calciumentzug und ANIT-Gabe 38

3.3.2.3.2. Maximalwerte der Leberbindung 39

3.3.2.4. Maximale Sekretionsrate 40

3.3.3. Charakterisierung des Effluxes ins Perfusat bei Calciummangel und ANIT-Vorbehandlung 41

3.3.3.1. Erläuterungen zur Radioaktivitätsverteilung nach Pulsmarkierung im Fließgleichgewicht 41

3.3.3.2. Gegenüberstellung der Radioaktivitätsverteilung in Galle und Perfusat nach ANIT-Behandlung und bei Calciummangel 42

3.3.3.3. Beurteilung der Perfusateffluxe unter kinetischem Gesichtspunkt 45

3.3.3.3.1. Kinetisches Verhalten des Radioaktivitätsverlaufs in Galle und Perfusat 45

3.3.3.3.2. Unterscheidung zwischen sezerniertem und sinusoidalem Efflux aufgrund kinetischer Daten 47

3.3.4. Langfristige Wirkung von vorübergehendem Calciumentzug 51

4. DISKUSSION 53

4.1. Die ANIT-induzierte Cholestase 53

4.1.1. Schädigung der "tight junctions" und Sekretionshemmung 53

4.1.2. Aufnahmehemmung durch ANIT 54

4.2. Untersuchung mit anderen Cholestatica 55

4.3. Gegenseitige Ergänzung von Elektronenmikroskopie und physiologischen Studien 56

4.4. Die Cholestase nach extrazellulärem Calciumentzug 56

Seite

4.4.1. Die erhöhte Permeabilität der "tight junctions" als unbedeutende Begleiterescheinung 56

4.4.2. Wirkung des Calciumentzugs auf Transporteigenschaften 58

4.4.3. Mögliche Angriffspunkte des Calcium-ions bei der Gallebildung 60

4.4.3.1. Leberbindung gallengängiger Substanzen 60

4.4.3.2. Exozytotische Vorgänge 60

4.4.3.3. Wechselwirkung von Calcium und Plasmamembran 61

4.4.4. Fragen zur Reversibilität der Sekretionshemmung durch extrazellulären Calciumentzug 63

4.5. Möglichkeiten der Radiopulsanalyse des Perfusateffluxes an der perfundierten Rattenleber 64

5. ZUSAMMENFASSUNG 65

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 67

7. LITERATURVERZEICHNIS 68

1. EINLEITUNG

In dieser Arbeit sollen zwei Cholestasetypen vorgestellt werden, die sich beide unter den Oberbegriff "Intrahepatische Cholestase" einordnen lassen, aber auf zwei grundlegend verschiedenen Mechanismen beruhen. Anhand der Skizze in Abb. 1 sollen diese zwei Möglichkeiten der Cholestase erläutert werden:

Leberzellen, wie alle Epithelzellen polar gebaute Zelltypen, halten einen gerichteten Substanztransport von der Sinusoidal (Blut)-Seite zur Gallenseite aufrecht. Eine interzelluläre Permeabilitätsschranke, die "zonulae occludentes", heute häufig mit dem englischen Ausdruck "tight junctions" bezeichnet, verhindert den Rückfluß von Gallenkomponenten auf die Sinusoidalseite (11,14,28).

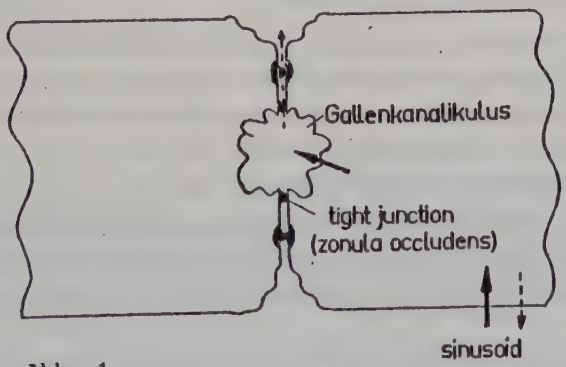


Abb. 1

Ursache einer Cholestase könnte eine erhöhte Permeabilität der "tight junctions" sein, ohne daß die Sekretion betroffen sein muß (TypI-Cholestase). Die zweite Möglichkeit wäre eine Hemmung des Transports an irgendeiner Stelle während der Zellpassage. Diese werde ich global als Sekretionshemmung zusammenfassen (TypII-Cholestase). In diesem Falle hat eine möglicherweise zusätzliche Schädigung der "tight junctions"

nichts mehr mit der eigentlichen Auslösung der Cholestase zu tun.

Die im folgenden beschriebene Cholestase, hervorgerufen durch extrazellulären Calciumentzug an der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber, ist begleitet von einer Schädigung der "tight junctions" (19,23). Es stellte sich nun die Frage, ob diese Tatsache zur Erklärung der Cholestase ausreiche (TypI-Cholestase) oder ob eine Sekretionshemmung die eigentliche Ursache sei (TypII-Cholestase). Schon bald gab es Hinweise darauf, daß nicht alle durch Calciumentzug hervorgerufenen Erscheinungen mit einer erhöhten Permeabilität der interzellulären Diffusionsschranke zu begründen waren (siehe 3.2.) (23,24,32,33). Aber erst dank der weitgehenden Klärung der ANIT-induzierten Cholestase, die aufgrund unserer experimentellen Befunde (34) als intrahepatisch vom Typ I aufzufassen ist, war es möglich, in dieser Frage einen entscheidenden Schritt voranzukommen.

Ziel dieser Studien ist es nun, in einer Gegenüberstellung mit der ANIT-induzierten die Andersartigkeit der durch Calciummangel hervorgerufenen Cholestase zu beschreiben und die weitgehende physiologische Bedeutung von Calcium im Gallesekretionsprozeß zu untermauern.

Der erste Teil (3.1.) dieser Arbeit widmet sich der Darstellung der Ergebnisse über die ANIT-induzierte Cholestase wegen ihrer Wichtigkeit für das Verständnis der Calciummangelwirkung.

Im zweiten Teil (3.2.) beschreibe ich Erscheinungen an der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber, die nach extrazellulärem Calciumentzug und nach Calciumsenkung auftreten und die die Vermutung über eine weitgehende Rolle des Calciums im Transportprozeß bestärken.

Der dritte Teil (3.3.) stellt beide Cholestaseformen unter verschiedenen Aspekten anhand der Ergebnisse einer Experimentserie gegenüber und veranschaulicht so die Andersartigkeit der Calciummangelcholestase.

2. MATERIAL UND METHODEN

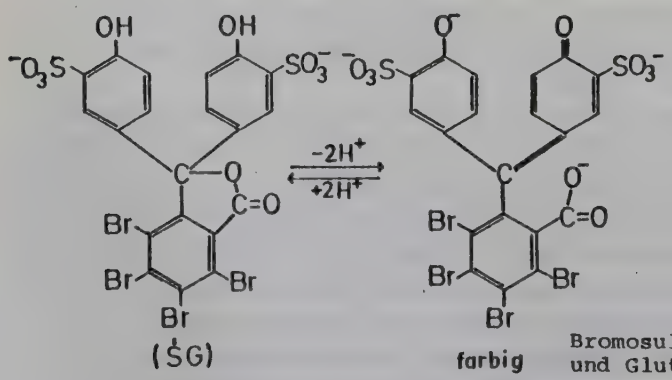
2.1. Substanzen

α-Naphthylisothiocyanat stammte von Eastman Kodak Co. (USA), Taurocholsäure (Natriumsalz) von Fluka AG (Schweiz) und Bromosulfophthalein (Dinatriumsalz) von Merck AG, Darmstadt. Oxidiertes Glutathion lieferte Sigma Chemie GmbH, München; Glutathionreduktase aus Hefe (1 mg/ml, ca. 90 U/mg), NADPH·Na_4, DTNB (Ellman's Reagenz) waren von Boehringer GmbH, Mannheim, die übrigen Substanzen von Merck AG, Darmstadt.
^{3}H-Taurocholsäure, ^{3}H-Inulin, ^{14}C-Sucrose, ^{3}H-Wasser und ^{32}P-Orthophosphorsäure wurden von der Firma NEN Chemicals, Dreieich, bezogen, ^{35}S-BSP und ^{14}C-Erythrit von Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig.

2.2. Perfusionstechnik

Alle Versuche wurden an Lebern (6-10 g) von männlichen Wistar-Ratten (160-250 g) durchgeführt. Die Tiere hatten freien Zugang zum Futter. Die Operation lief unter Äthernarkose ab (weitere Einzelheiten zur Operations- und Perfusionstechnik siehe auch 1, 64).
Als Perfusionsmedium diente Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer (18 mM $NaHCO_3$, glucosefrei) (31); eine Rollenpumpe beförderte es mit konstanter Geschwindigkeit von 3-4 ml/g/min durch die Leber. Über einen Schlauchoxigenator, bestehend aus einem thermostatisierbaren Messingblock und einem ca. 10-12 m langen, gasdurchlässigen Silikonkautschukschlauch (lichte Weite 2 mm, Wandstärke 0,2 mm, Fa. Detakta, Hamburg) wurde das Medium mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) begast und auf einer Temperatur von 37°C gehalten, so daß der pH-Wert im Bereich zwischen 7,3 und 7,4 lag. Der Sauerstoffverbrauch

(ca. 1,8 - 2,0 µmol/g/min) wurde polarographisch mit einer Platinelektrode (Elektronikwerkstatt des DFG-Sonderforschungsbereichs 51, München) kontrolliert.
Die Calciumkonzentration des Mediums war 1,25 mM (Kontrollbedingungen), wenn keine abweichenden Angaben gemacht werden. Die Gesamtperfusionsdauer betrug nicht mehr als zwei Stunden.
Über eine Gallengangkanüle (0,4 mm Durchmesser) wurde die Galle tropfenweise gesammelt. Der Gallenfluß errechnete sich aus Tropfengewicht pro Tropfzeit und lag zwischen 1,0 bis 1,4 µl/g/min unter Kontrollbedingungen. Die Verzögerungszeit zwischen der Sekretion am Gallenkanalikulus und dem Erscheinen einer Substanz am Ende der Gallenkanüle ließ sich mit ^{14}C-Erythrit (11), ^{3}H-Wasser oder auch einem schnell in die Galle sezernierten Substrat (z.B. ^{35}S-BSP·SG) ermitteln.
Als gallengängige Substanzen dienten TCH und insbesondere BSP und sein Glutathionderivat BSP·SG. BSP wird in der Leber sehr effektiv gebunden, mit Glutathion konjugiert und zu ca. 90 % in konjugierter Form und zu ca. 10 % unverändert in die Galle sezerniert (16,21,29,30,68). Beide Substanzen waren wegen ihrer spektroskopischen Eigenschaften und wegen ihrer einfachen Trennbarkeit im Perfusat gut geeignet (siehe unten).



Bromosulfophthalein und Glutathionkonjugat

2.3. Versuchsanordnungen

Gewisse experimentelle Besonderheiten sind hier nicht aufgeführt, sondern sind aus Gründen der Übersichtlichkeit an entsprechenden Stellen des Ergebnisteils zu finden.

2.3.1. Durchführung der ANIT-Experimente unter 3.1.

ANIT (25 mg/100 g Körpergewicht in 125 µl Olivenöl) wurde den Ratten oral über eine Schlundsonde als einmalige Dosis verabreicht. In verschiedenen zeitlichen Abständen nach ANIT-Gabe wurden die Lebern perfundiert bzw. für die Elektronenmikroskopie fixiert (15).
Nach einer offenen Vorperfusion von 30 min nahm jeder Einzelversuch 25 min in Anspruch: 200 ml Perfusionsmedium, dem eine bestimmte Menge BSP (1,6 µmol = ca. 170-200 nmol/g Leber) und TCH (2 µmol = ca. 210-250 nmol/g Leber), markiert mit ca. 3 µCi ^{3}H-TCH, beigegeben war, durchströmte rezirkulierend die Leber. Außerdem enthielt das Medium im allgemeinen 2,5 µCi ^{14}C-Sucrose (ca. 0,1 mM) und 1 µCi ^{32}P-Orthophosphat oder letzteres alleine als extrazelluläre Markersubstanzen (siehe 3.1.2.3.). In Fällen, in denen radioaktives BSP Verwendung fand (insbesondere zur Bestimmung der Metabolite), wurde auf die Zugabe letzterer Substanzen verzichtet.

2.3.2. Versuchsdurchführung bei Calciumsenkung unter 3.2.

Während einer offenen Perfusion wurde BSP ca. 10 bis 15 min infundiert mit Infusionsraten, die am oder oberhalb vom Transportmaximum (ca. 11 nmol/g/min) lagen. Beim Umschalten auf das Calciummangelmedium wurde die Infusion abgebrochen, um Überlagerungen von Substrateffluxen ins Perfusat mit infundiertem BSP zu vermeiden.

2.4. Synthese von BSP·SG

Älteren Ratten (ca. 350 g) wurde unter Urethan-Narkose (0,6 ml 20 %ige Urethanlösung/100 g Körpergewicht intraperitoneal) eine Gallenkanüle gelegt und BSP (ca. 20 mM) in 0,9 %iger Kochsalzlösung langsam infundiert (ca. 200 nmol/min über 5-6 h). Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der gesammelten Galle im halbquantitativen Verfahren (1 Teil Galle + 1 Teil Methanol als Bande aufgetragen) wurde die untere Bande abgenommen und mit Ammoniakwasser eluiert (siehe 2.8.). Das Endprodukt war frei von Gallensäuren, aber leicht verunreinigt durch einen Bilirubinmetaboliten. Die später angewandte chemische Methode der BSP·SG-Synthese nach Whelan et al. (68) erwies sich der biochemischen in Arbeitszeit, Ausbeute und Reinheit als deutlich überlegen.

2.5. Messung von TCH

Die verwendete Gallensäuremenge wurde radioaktiv mit ^{3}H-TCH markiert und die Radioaktivität der Galle- und Perfusatproben im Szintillationszähler BF 5001 (Fa. Berthold, Wildbad) gemessen. Mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität ließ sich die jeweilige Konzentration berechnen.

2.6. Messung von BSP bzw. BSP·SG

Die optische Dichte wurde bei 578 nm im basischen Milieu (pH 10-10,5) am Eppendorf-Photometer 1101 bestimmt. Der Zusatz des Komplexbildners EDTA verhinderte die Ausfällung von $Ca(OH)_2$ und $Mg(OH)_2$.
Bei Verwendung der radioaktiven Substanzen wurde entsprechend 2.5. verfahren.

2.7. Trennung von BSP und BSP·SG

Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von Sephadex für BSP und BSP·SG ließen sich zur Trennung beider Substanzen im Perfusat ausnutzen; auf diese Weise konnten eine Vielzahl von Perfusatproben in kurzer Zeit aufgearbeitet werden.
Über einen pH-Bereich von 4,0 - 6,5 bindet Sephadex G15 bei Zimmertemperatur und den angegebenen Mengenverhältnissen BSP zu ca. 80 % und BSP·SG zu ca. 20 %.

2.7.1. Verfahren

Es wurde für jede Probe

1. die Gesamtmenge an BSP,
2. die noch verbliebene Menge im Überstand nach der Sephadextrennung

bestimmt.
Die Mengenverhältnisse waren so gewählt, daß die Bindungskapazität des Sephadex nicht überschritten wurde und die Restmenge im Überstand mit der gebundenen Menge im Gleichgewicht war. Mit Hilfe der vorher ermittelten Bindungskonstanten an Sephadex für BSP und für BSP·SG (siehe unten) ließen sich jeweils die Mengenanteile beider Substanzen errechnen, eine Rechnung, die man einem Rechner übertrug (siehe auch 2.9.).

2.7.2. Durchführung

1. Sephadex G15-Suspension wurde in 100 mM Citratpuffer (Citrat/NaOH; pK = ca. 6,0) auf pH 5,5 eingestellt (+ etwas Azid zur Verhinderung von Bakterienwachstum).
2. Probenaufarbeitung bei Verwendung der radioaktiven Substanzen:

a) Zur Messung der Gesamtmenge an BSP wurden 443 µl[+)] Perfusat auf 500 µl mit Medium ergänzt und ausgezählt (siehe 2.9.);

b) Zu 100 µl zähflüssiger Sephadex-Suspension (Bettvolumen ca. 80 µl) wurde 550 µl Perfusat pipettiert; nach Schütteln von 5 bis 10 min und Zentrifugation wurden 500 µl zum Auszählen abgenommen.

3. Die Bindungskonstanten α und β (siehe 2.7.3.) ergaben sich gemäß oben beschriebener Aufarbeitung aus den an Sephadex gebundenen, reinen Substanzen.

4. Ein Zähl- und Rechenprogramm für den Szintillationszähler druckte nach Eingabe der notwendigen Daten (Bindungskonstanten α und β; spezifische Radioaktivität ε) und nach paarweiser Zählung der Proben (2. a und b) die jeweilige Konzentration für BSP und BSP·SG aus.

[+)] 443 µl ergeben sich aus der Verdünnung durch die Sephadex-Suspension:

$$V_P = \frac{V_P(S) \cdot V_{\ddot{U}}(S)}{V_P(S) + V_S - V_{Seph}}$$

V_P = auszuzählendes Perfusatvolumen zur Bestimmung der Gesamtmenge an BSP (443 µl)

$V_P(S)$ = zur Sephadex-Suspension zugegebenes Perfusatvolumen (550 µl)

$V_{\ddot{U}}(S)$ = vom Sephadexüberstand abgenommenes Volumen (500 µl), das 443 µl Perfusat entspricht

V_S = Volumen der Sephadex-Suspension (100 µl)

V_{Seph} = Eigenvolumen der Sephadexmenge, für BSP·SG als nicht zugänglich angenommen (ca. 30 µl)

2.7.3. Berechnung der Konzentrationen

Ausgehend von den Grundgleichungen (1) und (2) war es möglich, die Konzentrationen für BSP und BSP·SG zu berechnen:

$$B_t = \varepsilon(B + BG) \quad (1)$$

$$B_S = \varepsilon(B - \alpha B + BG - \beta BG) \quad (2)$$

aus (1): $(1 - \alpha)B_t/\varepsilon = (1 - \alpha)B + (1 - \alpha)BG$ (3)

aus (2): $B_S/\varepsilon = (1 - \alpha)B + (1 - \beta)BG$ (4)

Durch Substraktion von (3) und (4) ergibt sich:

$$(\beta - \alpha)BG = (1 - \alpha)B_t/\varepsilon - B_S/\varepsilon$$

$$BG = \frac{(1 - \alpha)B_t - B_S}{\varepsilon(\beta - \alpha)}$$

$$B = B_t/\varepsilon - BG$$

Es bedeuten:

BG = Konzentration von BSP·SG in µM

B = Konzentration von BSP in µM

B_t = cpm der Gesamtmenge an BSP pro 443 µl Perfusat

B_S = cpm der Restmenge an BSP in 500 µl Sephadex-Überstand

$\alpha = B_{gebunden}/B_{gesamt}$

$\beta = BG_{gebunden}/BG_{gesamt}$

ε = spezifische Radioaktivität in cpm/nmol

2.7.4. Trennung von BSP und BSP·SG in der Galle

Nach entsprechender Verdünnung ist dieses Verfahren prinzipiell auch auf die Galle anwendbar: bis wenigstens 25 nmol pro 100 µl Sephadex-Suspension waren die Bindungskonstanten α und β weitgehend unabhängig von der Konzentration. Komplikationen traten durch einen dritten, in der Galle vorkommenden Metaboliten (68) auf, der sich nicht auftrennen ließ,

sondern sich vermutlich ambivalent verhielt. Sein Anteil konnte mit ca. 5 - 10 % der BSP-Gesamtmenge bestimmt werden. Für eine saubere Auftrennung der Galle greift man besser auf die Dünnschichtchromatographie zurück (siehe 2.8.).

2.8. Dünnschichtchromatographische Trennung der BSP-Metabolite in der Galle (59)

DC-Platten: Kieselgel 60 der Fa. Merck
Probenmenge: Ca. 5 µl Galle + ca. 10 µl Methanol
Fließmittel: 2 Teile tert. Butanol + 1 Teil Wasser

Zur Bestimmung der einzelnen Metabolitanteile wurden die Flecken nach Anfärben mit Ammoniakdämpfen herausgekratzt und ausgezählt, sofern die radioaktive Substanz verwendet wurde, oder optisch bestimmt nach Elution vom Trägermaterial im basischen Milieu.

2.9. Radioaktivitätszählung

500 µl Perfusatprobe wurde in kleinen Zählgläschen (6 ml, Fa. Zinsser) mit 25 µl 3 M Trichloressigsäure und 4 ml Szintillator (Unisolve I, Fa. Zinsser) versetzt und ausgezählt (Szintillationszähler Fa. Berthold BF 5001).
Die Gallenproben wurden im allgemeinen tropfenweise nach Verdünnung auf 500 µl entsprechend behandelt und analysiert.

Dreifachmarkierung:
Die Trennung von bis zu drei Isotopen (^{3}H, ^{14}C oder ^{35}S, ^{32}P) war mit Hilfe eines Rechenprogramms für den dem Zähler angeschlossenen Rechner (Typ: Diehl Algotronic) in kurzer Zeit möglich: die jeweiligen Einstreufaktoren der Isotope in die Kanäle der anderen mußten vorher mit Zählproben des reinen Isotops bestimmt und dann im Rechner gespeichert werden.

2.10. Bestimmung von Glutathion (GSH)

Die Gesamtmenge an GSH und die oxidierte Form (GSSG) wurden mit Hilfe der GSH-Dehydrogenase-katalysierten Reaktion über die Zunahme von NADPH optisch gemessen.

2.10.1. Aufarbeitung der Proben

a) Enteiweißung
800 µl Perfusat + 130 µl $HClO_4$ (2,4 M)

b) Neutralisation
Nach Zentrifugation:
Überstand + 150 µl KOH (3 M)
+ 50 µl 0,5 M MOPS-K^+-Puffer (pH 7,0)
Zentrifugation bei 0°C zur vollständigen Abtrennung von $KClO_4$

Die Gallenproben wurden ohne Enteiweißung 1:50 bis 1:100 in mit $HClO_4$ versetztem und neutralisiertem Medium (Mengenverhältnisse wie unter a) und b)) verdünnt.

2.10.2. Gesamtglutathionbestimmung

Die Gesamtmenge an GSH wurde nach der kinetischen Methode (Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit) mit Hilfe von Ellman's Reagenz und der Glutathion-Reduktase-Reaktion gemessen (65).

Gerät : Eppendorf-Photometer 1101
Wellenlänge: 405 nm
Temperatur : 26°C
GSH-Mix : 30 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0
+ EDTA (Spatelspitze)
+ 4 mg NADPH (= 4,8 µmol)
+ 1,4 ml DTNB (1 mg/ml 1 %ige $NaHCO_3$-Lösung)

Glutathion-Reduktase:
1:50 mit Puffer verdünnt

Testansatz: 500 µl Mix (= 80 nmol NADPH, 55 nmol DTNB)
+ 50 µl Probe
+ 10 µl Glutathion-Reduktase[+)]

Leerwert : Der Extinktionssprung durch Enzymzugabe wurde in reinem Medium gemessen.

Eichung : mit GSSG-Standard (10 µM GSSG = 20 µM GSH: 1 mM GSSG-Lösung wurde 1:100 verdünnt)

2.10.3. GSSG-Bestimmung

Die Extinktion von NADPH wurde bei zwei Wellenlängen am Doppelwellenlängenspektrophotometer gemessen und die Differenz registriert (Endpunktsbestimmung). Auf diese Weise konnte man das Hintergrundrauschen unterdrücken und die Empfindlichkeit erhöhen (62).

Gerät : Shimadzu-Spektrophotometer (UV 300)
Wellenlänge: 340 und 380 nm
Spreizung: 20 mE

GSSG-Mix: 20 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0
+ 100 µl NADPH (4 mg/ml 1 %ige $NaHCO_3$-Lösung)
+ Spatelspitze EDTA

Glutathion-Reduktase:
ca. 1:25 verdünnt mit Kaliumphosphatpuffer

Testansatz (in Quarzküvetten):
500 µl Probe von 2.10.1.
+ 200 µl Mix (= 4,8 nmol NADPH)
+ 5 µl Glutathion-Reduktase

Leerwert: Der Enzymsprung wurde mit 500 µl Puffer bzw. Medium der Probe bestimmt

---

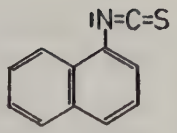
[+)] Das Enzym wurde mit einer Hamiltonspritze bzw. einer Konstriktionspipette pipettiert, damit die Enzymmenge konstant blieb.

3. ERGEBNISSE

3.1. Die ANIT-induzierte Cholestase

3.1.1. ANIT-Wirkungen

ANIT (α-Naphthylisothiocyanat), ein Fremdstoff ohne medizinische Bedeutung, ist seit langem im Tierversuch eine Modellsubstanz zur Erzeugung einer intrahepatischen Cholestase (3,51,55).



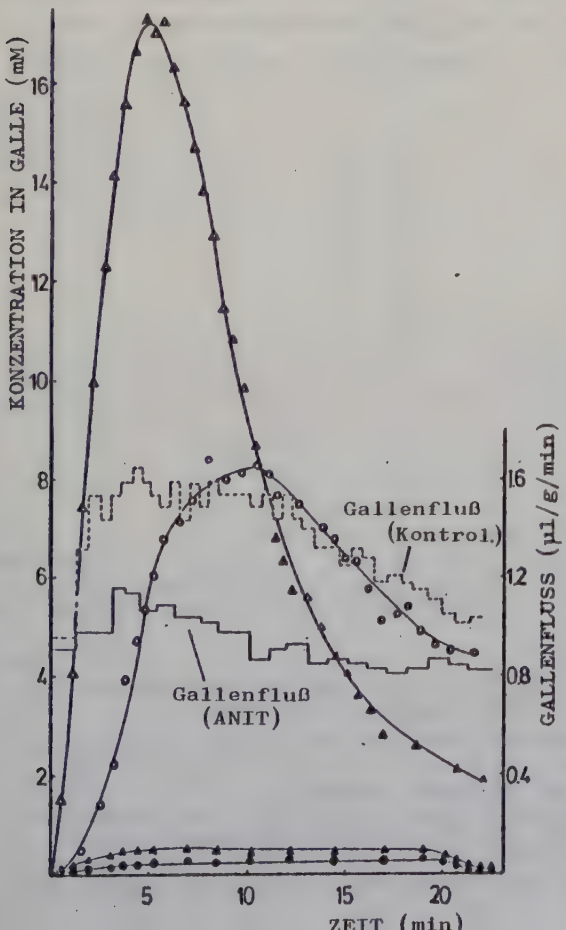


Abb. 2A:

Gallenfluß und Sekretion von TCH und BSP ohne und nach Vorbehandlung mit ANIT.

25 mg ANIT/100 g Körpergewicht wurde in Olivenöl oral 10 h vor der Operation verabreicht. Die Lebern wurden bei 37°C, pH 7,3-7,4 hämoglobinfrei perfundiert. Nach 30 min offener Vorperfusion wurde eine einmalige Dosis von 1,6 µmol BSP und 2,0 µmol TCH auf 200 ml Medium gegeben und rezirkuliert. Es bedeutet: Δ——Δ, ▲——▲ Konzentration von TCH in der Galle der Kontrolle (Δ) und nach ANIT-Gabe (▲); o——o, ●——● Gesamtkonzentration an BSP in der Galle der Kontrolle (o) und nach ANIT-Gabe (●).

Die Absicht dieser Arbeit war, die zeitliche Entwicklung der Sekretionsparameter, wie Gallenfluß, Sekretionsraten und Konzentrationen von BSP im Perfusat, einerseits und der Leberstruktur andererseits zu verfolgen.

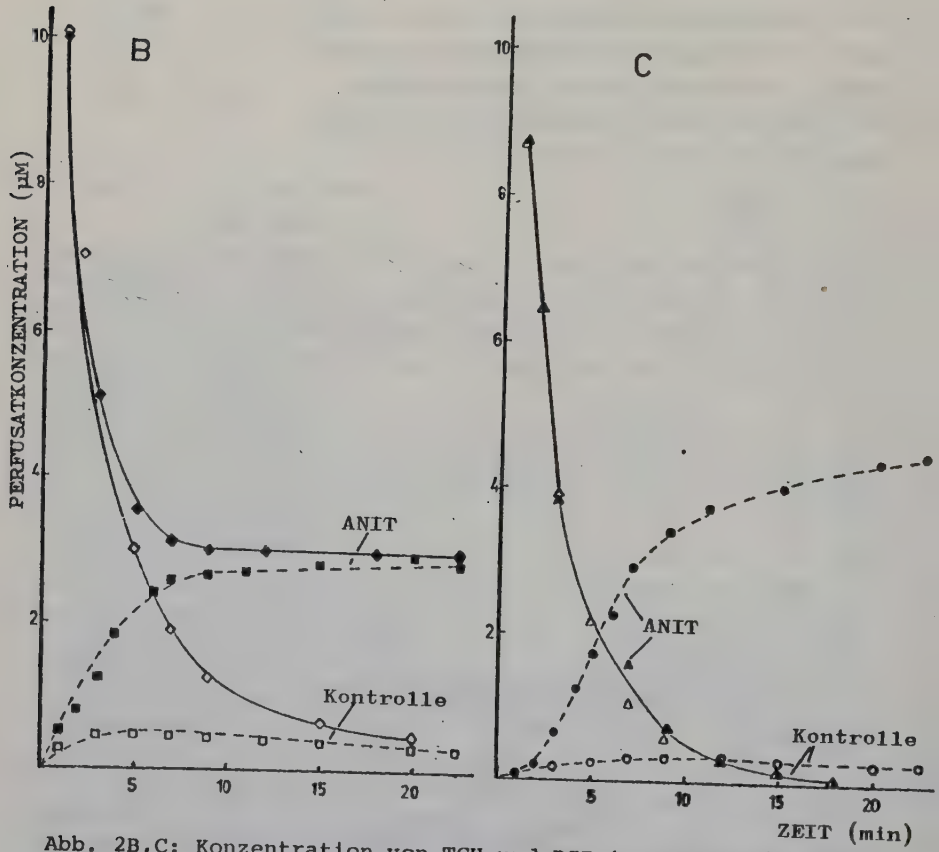


Abb. 2B,C: Konzentration von TCH und BSP im Perfusionsmedium vor und im Perfusat hinter der Leber.

Bedingungen wie unter Abb. 2A beschrieben. BSP·SG im Perfusat wurde mit Hilfe einer Sephadextrennungstechnik bestimmt (siehe 2.7.).
Die Symbole bedeuten: ◇——◇ , ◆——◆ TCH-Konzentration vor, □---□ , ■---■ TCH-Konzentration hinter der Leber; Δ——Δ, ▲——▲ BSP-Konzentration vor, o---o, ●---● BSP·SG-Konzentration hinter der Leber.

Abb. 2A-C veranschaulichen ein Beispiel der Verteilung der verabreichten Dosen an einer ANIT-behandelten Leber (10 h nach Gabe) gegenüber der Kontrolle:

Obwohl der Gallenfluß nach dieser Zeit der ANIT-Einwirkung noch recht hoch ist (ca. 0,8 - 0,9 µl/g/min gegenüber der Kontrolle mit 1,4 µl/g/min), sind die Konzentrierungsfähigkeit in der Galle und die Stimulierbarkeit des Gallenflusses durch TCH minimal (Abb. 2A). Die Perfusatspiegel beider Substrate steigen stark an, wobei wir durch Sephadextrennung (2.7.) zeigen konnten, daß BSP ausschließlich als Glutathionkonjugat (BSP·SG) vorliegt (Abb. 2B,C). Die anfänglichen Aufnahmegeschwindigkeiten zeigen gegenüber der Kontrolle keine Veränderungen, wie aus dem Abfall der Konzentrationen im Perfusat vor der Leber ersichtlich ist.

3.1.2. Zeitliche Entwicklung der Sekretionsparameter und morphologische Veränderungen nach ANIT-Gabe

3.1.2.1. Gallenfluß

Der Gallenfluß ist bis etwa zur zehnten Stunde der ANIT-Einwirkung kaum verändert. Erst danach fällt er steil ab (Abb. 3).

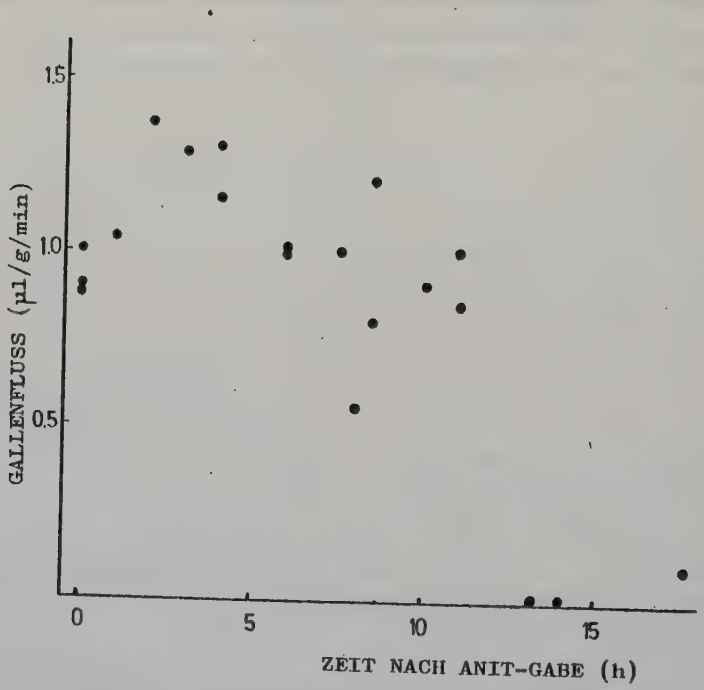


Abb. 3: Entwicklung des maximalen Gallenflusses (nach Stimulation durch TCH) in Abhängigkeit von der ANIT-Einwirkungszeit.

Bedingung wie in Abb. 2A. Jeder Punkt entspricht einer dort dargestellten Einzelperfusion zur angegebenen Zeit nach ANIT-Gabe (Kontrolle: Zeitpunkt 0).

3.1.2.2. Maximale Sekretionsraten und Gleichgewichtskonzentrationen im Perfusat

Die maximalen Sekretionsraten von TCH und BSP fallen von der vierten bis fünften Stunde an steil ab, während zur selben Zeit ihre Gleichgewichtskonzentrationsspiegel im Perfusat ansteigen (Abb. 4A,B). Nach einer ANIT-Einwirkungszeit von ca. 10 h erreicht die Sekretion ein Minimum, wohingegen die Gleichgewichtskonzentration einem Maximum zustrebt. Beide Parameter verändern sich also genau gegenläufig.

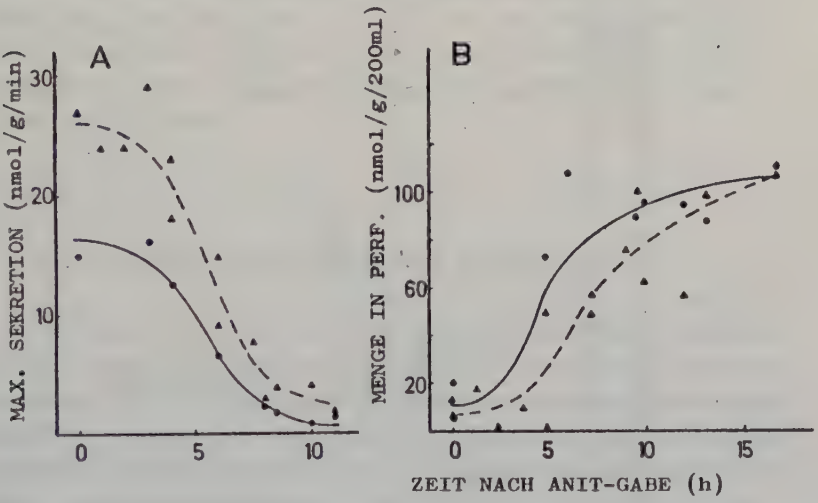


Abb. 4A,B: Maximale Sekretionsraten (A) und Gleichgewichtskonzentrationen im Perfusat (B) von TCH (▲——▲) und Gesamt-BSP in der Galle bzw. BSP·SG im Perfusat (●---●)+) in Abhängigkeit von der Zeit nach ANIT-Applikation.
Bedingungen siehe Abb. 2A und 3. B: Zwecks Normierung ist die Perfusatkonzentration (angegeben in nmol/200 ml) auf das Lebergewicht bezogen.

+) Im Perfusat konnten keine nennenswerten Mengen BSP nachgewiesen werden, während in der Galle noch ca. 10 % unkonjugiert vorlagen.

3.1.2.3. Permeabilität von extrazellulären Markersubstanzen, ^{14}C-Sucrose und ^{32}P-Orthophosphat, in die Galle

Da Sucrose von der Leberzelle nicht aufgenommen wird (13,60), gilt ihr Erscheinen in der Galle als Maß für die Permeabilität der "tight junctions". ^{32}P-Orthophosphat hingegen tauscht zwar schnell mit dem intrazellulären Phosphat aus, erscheint aber aus noch unbekannten Gründen in nicht nen-

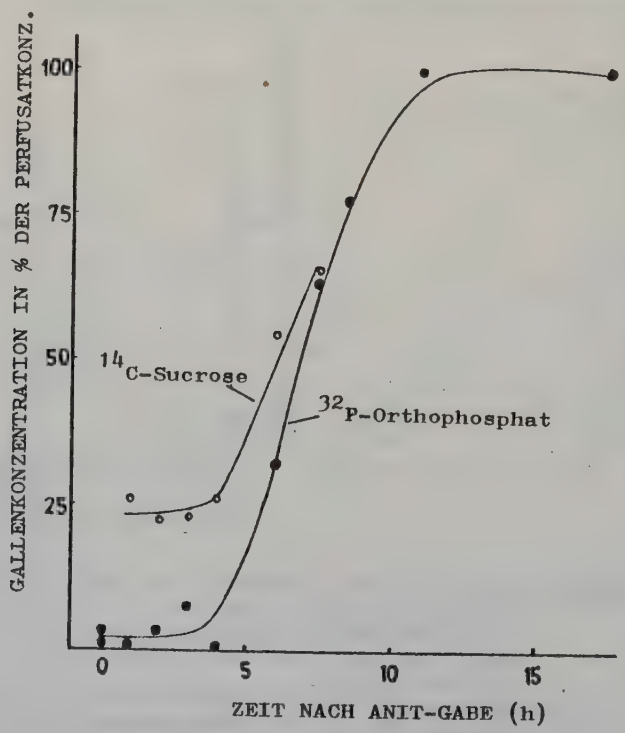


Abb. 5: Permeabilität von ^{14}C-Sucrose und ^{32}P-Orthophosphat als Indikatoren für die Durchlässigkeit der "tight junctions" in Abhängigkeit von der ANIT-Einwirkungszeit bei unverändertem Gallenfluß (siehe Abb. 3).

Allgemeine Durchführung wie in Abb. 2A-C. Es wurde in Gegenwart von BSP und TCH mit 0,1 mM ^{14}C-Sucrose (2,5 µCi) und ^{32}P-Orthophosphat (1 µCi) rezirkuliert.

nenswertem Ausmaße in der Galle. Als negativ geladenes Molekül erweist es sich sogar als besserer Indikator der veränderten Durchlässigkeit dieser zwischenzellulären Diffusionsschranke (4).

Abb. 5 demonstriert, daß genau zu dem Zeitpunkt der gegenläufigen Änderungen der oben erwähnten Sekretionsparameter auch die Konzentrationen beider extrazellulärer Marker in der Galle ansteigen. Die Konzentration in der Galle allein ist im Falle der Diffusionslimitierung nicht aussagekräftig, da ja auch bei einem Abfall des Gallenflusses eine Konzentrationszunahme zu erwarten wäre. Da nun aber dieser in der fraglichen Phase konstant bleibt (Abb. 3), muß es sich um eine tatsächliche Permeabilitätserhöhung über die "tight junctions" handeln.

3.1.2.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Metz, Heidelberg, war es möglich, auch elektronenmikroskopisch nach dem Gefrierätzverfahren (41) morphologische Veränderungen der "tight junctions" nachzuweisen (34). Deutlich sichtbar wird die Schädigung bzw. ein Verschwinden dieser Strukturen erst nach längerer ANIT-Einwirkungszeit (ca. 13 h), so daß die hier beschriebenen physiologischen Studien die empfindlichere Untersuchungsmethode sind.

3.1.2.5. Schlußfolgerung

Es liegt nahe, die durch ANIT induzierte Cholestase auf die erhöhte Permeabilität der "tight junctions" zurückzuführen. Allerdings läßt sich bis hierher über eine mögliche Sekretionshemmung noch keine Aussage machen. Diesen Punkt werde ich im Zusammenhang mit der Frage nach der Herkunft des Ef-

fluxes gallengängiger Substanzen ins Perfusat im dritten Teil (3.3.3.) behandeln.

3.2. Die Wirkung von vorübergehendem Calciumentzug und kurzzeitiger Calciumsenkung auf die Sekretion

In diesem Abschnitt sollen die Erscheinungen nach plötzlicher, extrazellulärer Calciumsenkung beschrieben werden - unter besonderer Berücksichtigung der Abgabe der gallengängigen Testsubstanz ins Perfusat.

3.2.1. Umschalten auf calciumfreies Medium (Abb. 6)

Unter Kontrollbedingungen (1,25 mM Ca^{2+}) ist der Gallenfluß konstant, und die Sekretion von Gesamt-BSP (= BSP + BSP·SG) steigt an. Der Perfusatspiegel an BSP ist sehr gering (< 0,5 µM). Nach Calciumentzug fällt der Gallenfluß schnell ab; gleichzeitig gibt die Leber vorübergehend eine große Menge an BSP in konjugierter Form (BSP·SG) ab, die die vorangegangene Sekretionsrate übertrifft.

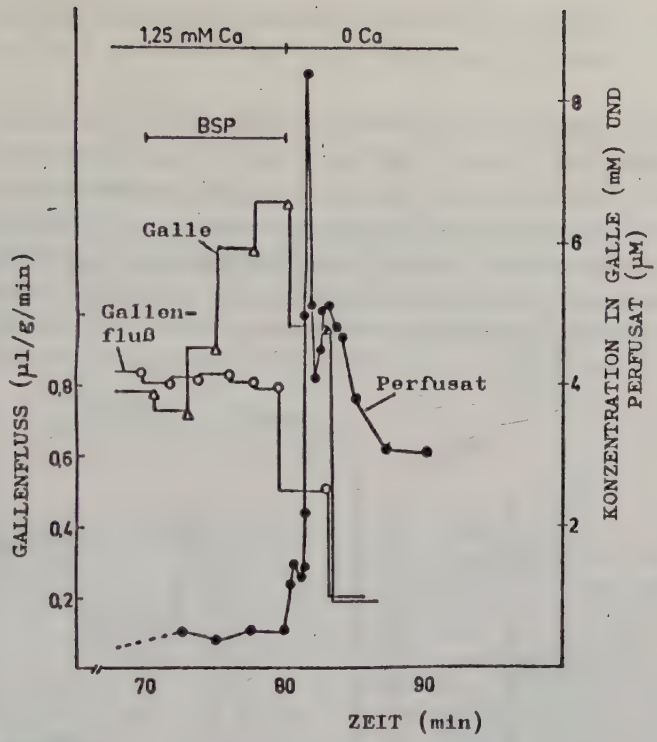


Abb. 6: Beispiel für die Sekretion von Gesamt-BSP und den Perfusatefflux von BSP·SG[+)] vor und bei Calciumentzug.

Während einer offenen Perfusion (Krebs-Henseleit-Medium, 37°C, pH 7,3 - 7,4) wurde BSP 10 min infundiert (Infusionsrate (I) = 13 nmol/g/min, durch Balken angezeigt) und bei Mediumwechsel (0 Calcium) abgesetzt.
Entsprechend 3.3.1.2. ergibt sich für die Sekretionsrate (S) bei Calciumentzug 5,5 nmol/g/min, für den maximalen Efflux 25 nmol/g/min, für die Leberbindung (L) bei Calciumentzug 110 nmol/g und für den Gesamtefflux über 5 min 70 nmol/g.

[+)] siehe Erläuterung von Abb. 4 und 2.2.

3.2.2. Senkung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 0,05 mM (Abb. 7)

Auch in diesem Falle tritt ein hoher Efflux an BSP·SG ins Perfusat auf; dieser läßt sich durch vollständigen Calciumentzug noch steigern. Die Auftragung der jeweiligen Abgaben als Geschwindigkeit [nmol/g/min] läßt einen unmittelbaren Vergleich zu: Man erkennt, daß der maximale Efflux die vorangegangene Sekretionsrate um ca. das Sechsfache übersteigt.

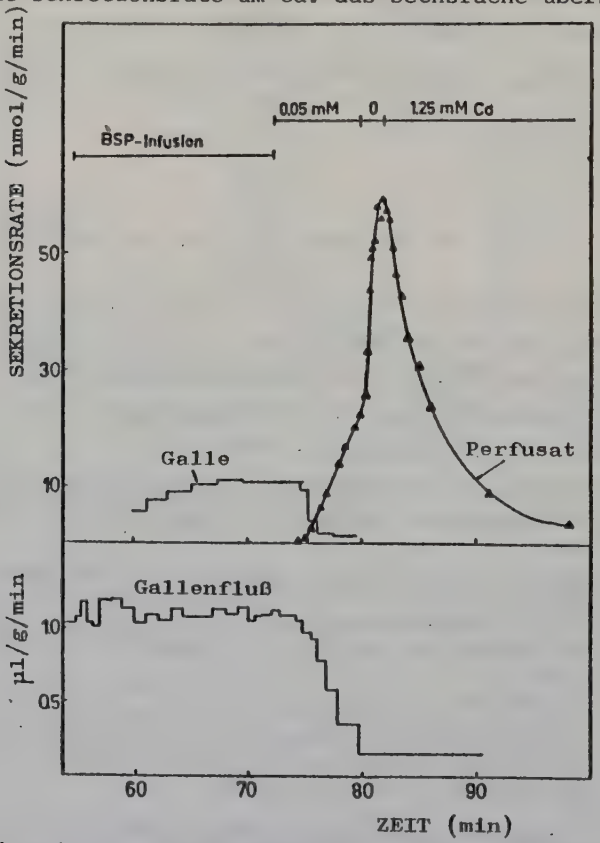


Abb. 7: Sekretion und Perfusatefflux von BSP vor und nach Senkung auf 0,05 mM und 0 Calcium im Perfusionsmedium.

Bedingungen analog zu Abb. 6. Spezielle Daten (Symbole siehe Abb. 6): I = 39 nmol/g/min; L = 460 nmol/g (bei 0 Calcium); Gesamtefflux über 5 min nach 0 Calcium = ca. 220 nmol/g.

3.2.3. Senkung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 0,1 mM (Abb. 8)

Schon bei 0,1 mM Calcium im Perfusionsmedium kann man einen Efflux ins Perfusat feststellen. Dieser ist, im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen, n i c h t von einem Abfall der Sekretion begleitet, da ja Gallenfluß und Konzentration in der Galle unverändert bleiben. Diese Abgabe ist mit einem Rückfluß von Galle ins Perfusat nicht ohne weiteres vereinbar. (Bemerkenswerterweise ist die Effluxerhöhung nach erneuter Calciumgabe nicht kurzfristig rückgängig zu machen.)

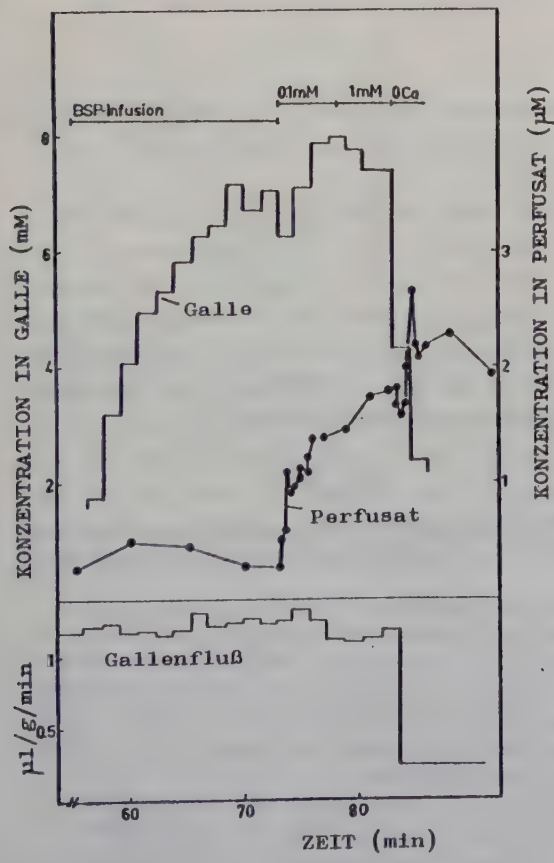


Abb. 8:

Sekretion und Perfusatefflux von Gesamt-BSP nach Calciumsenkung auf 0,1 mM.

Bedingungen analog zu Abb. 6. Zwischen BSP und BSP·SG wurde in diesem Falle nicht unterschieden. Spezielle Daten (Symbole siehe Abb. 6): I = 16 nmol/g/min S = 9 nmol/g/min (vor und während der Calciumsenkung); L = ca. 160 nmol/g (bei Calciumsenkung); mittlerer Efflux infolge Calciumsenkung = 5 nmol/g/min.

3.2.4. Calciumentzug nach ANIT-Behandlung: Addition von ANIT- und Calciummangeleffekt

Entsprechend der im ersten Teil (3.1.) angesprochenen Versuchsdurchführung wurde die Verteilung einer BSP-Dosis (1,6 µmol) im rezirkulierenden System gemessen (Abb. 9). Eine BSP-Sekretion war fast nicht mehr vorhanden (ca. 0,5 nmol/g/min, nicht gezeigt). Im Augenblick der EGTA-Infusion über

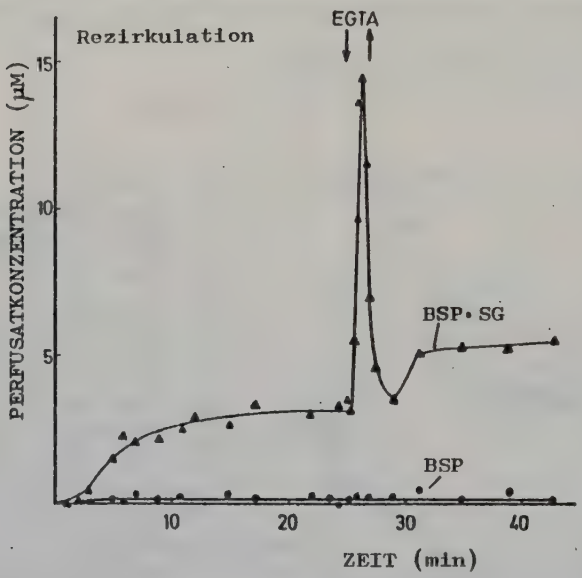


Abb. 9: Änderung der BSP- und BSP·SG-Konzentration unter dem Einfluß von EGTA als Calciumkomplexbildner nach ANIT-Vorbehandlung.

Bedingungen entsprechend Abb. 2A-C. Die Operation wurde 10 h nach ANIT-Gabe durchgeführt. Der Verlauf der Konzentration vor der Leber und die Restsekretion in die Galle (ca. 0,5 nmol/g/min) sind nicht gezeigt. EGTA wurde mit einer Endkonzentration von ca. 1,3 mM über 2 min infundiert. Im weiteren Verlauf der Rezirkulation wurde der Calciumverlust durch erneute Calciumgabe wieder ausgeglichen.
Spezielle Daten: Influx von BSP·SG im Gleichgewicht = ca. 10 nmol/g/min; Leberbindung (bei EGTA-Gabe) = 160 nmol/g; maximaler Efflux = ca. 40 nmol/g/min; Gesamtefflux (infolge EGTA-Infusion) = ca. 50 nmol/g/min.

2 min, wenn Calcium weggebunden wird, steigt die Konzentration an konjugiertem BSP im Perfusat vorübergehend sprunghaft an, während der BSP-Anteil weiterhin unmeßbar gering ist. Der Efflux infolge Calciumentzug überlagert sich demnach einem anderen, der durch die ANIT-Behandlung hervorgerufen wird.

Die in der Leber vorhandene Gesamtmenge an BSP zum Zeitpunkt des Calciumentzugs war ca. 160 nmol/g; der vorübergehende Gesamtefflux betrug 50 nmol/g. D.h., daß nur ein Teil der Lebermenge, ca. 25 bis 30 %, sehr schnell abgegeben wurde. Ähnliche Bedingungen galten auch an nicht vorbehandelten Lebern (33) (vgl. auch Abb. 6).

3.2.5. Abgabe einer nicht gallengängigen Substanz (Glutathion) ins Perfusat nach Calciumentzug

In der Zelle liegt Glutathion (GSH) zu ca. 90 % reduziert vor (Konzentration ca. 8 bis 9 mM) (22,63), während es unter unseren Perfusionsbedingungen in der Galle kaum in reduzierter Form vorkommt (63). GSH stellt somit einen intrazellulären Marker dar. Abb. 10 zeigt, daß nach Calciumentzug (EGTA-Infusion) im wesentlichen GSH ins Perfusat abgegeben wird; d.h., diese nicht gallengängige Substanz kann nur unmittelbar aus der Zelle stammen. (Der vorangehende, stete Anstieg von GSH und GSSG im Perfusat ist eine Folge einer geringen, ständig vorhandenen Abgabe, die sich während der Rezirkulation anhäufte.)

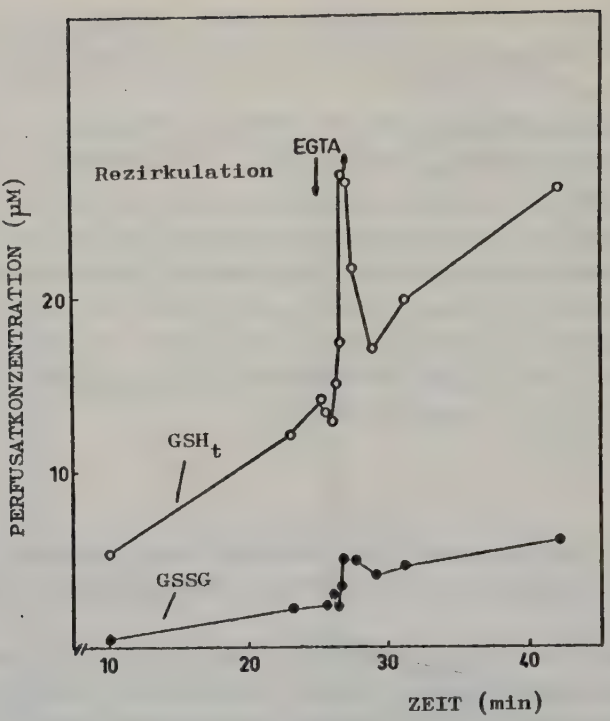


Abb. 10: Efflux von Gesamtglutathion (GSH_t) und oxidiertem Glutathion (GSSG) ins Perfusat vor und nach Calciumentzug mit EGTA.

Perfusionsbedingungen gemäß Abb. 2A-C und 9 ohne TCH- und BSP-Gabe. Spezielle Daten: Basisefflux an GSH = ca. 1,5 nmol/g/min; Maximalefflux an GSH nach EGTA-Infusion = ca. 35 nmol/g/min; Gesamtefflux an GSH infolge Calciumentzugs = ca. 45 nmol; Gesamtefflux an GSSG = 7 nmol; GSSG-Konzentration (Galle) = ca. 1 mM (nicht gezeigt).

3.2.6. Schlußfolgerung

Aus den angeführten Beispielen läßt sich folgern, daß es eine (kurzzeitige?) Abgabe von gallengängigen Substanzen nach Calciumentzug gibt, die mit einer erhöhten Permeabilität der "tight junctions" nicht erklärbar ist. Die Beurteilung der Herkunft dieses Effluxes ins Perfusat wird ein Schwerpunkt im folgenden dritten Teil sein (3.3.3.).

3.3. Untersuchungen im Fließgleichgewicht von steigender Infusion und Abgabe von BSP·SG bei Calciumentzug und nach ANIT-Vorbehandlung

3.3.1. Spezielle Versuchsbedingungen und Auswertungsmethoden

Ziel dieser Versuche war es festzustellen:

1. ob es Unterschiede in den Aufnahme- und Abgabeparametern unter Calciummangel und nach ANIT-Behandlung gegenüber der Kontrolle gibt und
2. woher der Efflux ins Perfusat jeweils stammt.

Dazu wurden den Lebern steigende Mengen an BSP·SG in fünf Infusionsphasen von jeweils 17,5 bis 20 min infundiert (Abb. 11); die Infusionsraten variierten von ca. 2 bis 30 nmol/g/min. Durch die Wahl der glutathionierten Substanz ließ sich eine Überlagerung des Transports über die Zelle mit der Konjugationsreaktion ausschließen. Im Fließgleichgewicht jeder Infusionsphase wurde das in die Leber infundierte BSP·SG mit einem 30 sec langen Puls von radioaktivem BSP·SG als Tracer und ^{3}H-Inulin als extrazellulärer Markersubstanz (13, 60) markiert. Es wurden bestimmt: der Gallenfluß und bei gegebener Infusionsrate die Konzentrationen von BSP·SG und ^{35}S-BSP·SG in Galle und Perfusat.

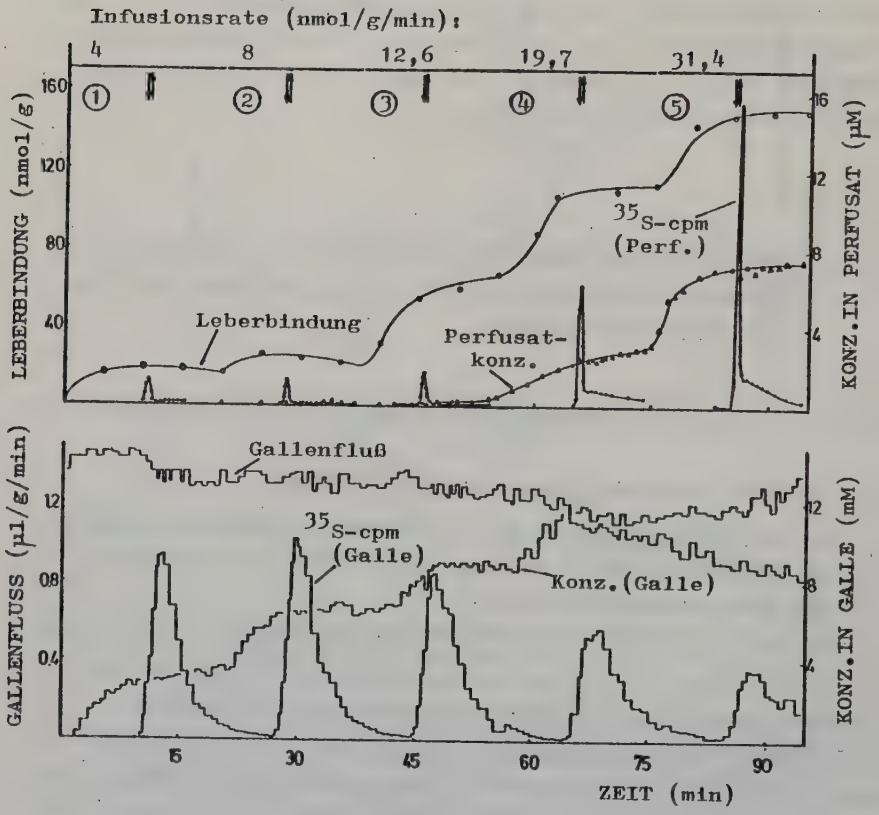


Abb. 11: Verteilung von BSP·SG und radioaktivem BSP·SG nach Pulsmarkierung in Perfusat, Leber und Galle in Abhängigkeit von steigenden Infusionsraten an unmarkiertem BSP·SG unter Berücksichtigung des Gallenflusses.

BSP·SG wurde über die Dauer der gesamten Perfusion infundiert, hier am Beispiel einer Kontroll-Leber dargestellt. Änderungen der Perfusionsraten zu den Zeitpunkten ① bis ⑤ sind angezeigt. Überlagernd wurden Pulse von Tracerdosen an ^{35}S-BSP·SG über 30 sec hinweg im Fließgleichgewicht gegeben (Anfang

3.3.1.1. Analyse eines Radioaktivitätspulses

Mit Hilfe dieser Pulsmarkierung konnte der jeweilige Durchfluß, d.h. der unmittelbar durchfließende Anteil der Infusionsrate, bestimmt werden (3.3.1.2.). In Abb. 12 ist der Verlauf beider Radioaktivitäten eines Pulses in zeitlich gestrecktem Maßstab exemplarisch aufgetragen: Die Fläche unter der Inulinkurve entspricht der Gesamtdosis (100 %); die unter der Kurve der Testsubstanz innerhalb des Inulinverlaufs gibt nach Abzug der zweiten Kinetik (siehe unten) den Durch-

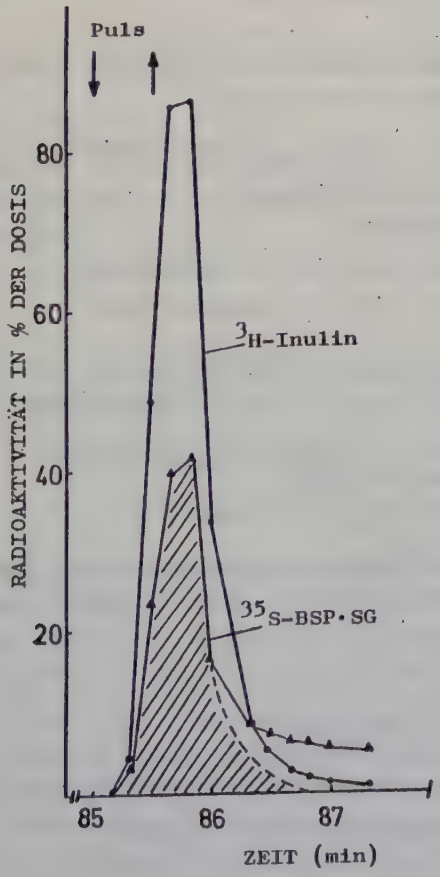


Abb. 12:

Beispiel für die Analyse eines ^{35}S-Radioaktivitätspulses von 30 sec mit ^{3}H-Inulin als extrazellulärem Marker.

Die Fläche unter der Inulinkurve entspricht der Gesamtdosis (100 % BSP·SG), die schraffierte Fläche dem Durchflußanteil der Radioaktivitätsdosis von ^{35}S-BSP·SG. Die Begrenzung dieser Fläche wurde durch Extrapolation der Verhältnisse der Anstiegsphasen beider Kurven auf die Abstiegsphasen ermittelt.

fluß als prozentualen Anteil von der Infusion (schraffierte Fläche) wieder. Der Schnittpunkt mit dem Kurvenverlauf der Inulinradioaktivität verrät, daß sich der Durchflußkinetik noch eine zweite Effluxkinetik überlagert, die, wie bereits oben angedeutet, abgezogen werden muß: aus den Radioaktivitätsverhältnissen des ansteigenden Astes jeder Kurve läßt sich der ideale Verlauf der Testradioaktivität im absteigenden Teil bestimmen und damit auch der Durchfluß.

3.3.1.2. Meßbare und errechenbare Größen

Auf diese Weise lassen sich in jeder Infusionsphase folgende Größen ermitteln (Symbole siehe unten):

1. die Sekretionsrate $S = F \times c_G$ in nmol/g/min
2. der Gesamtefflux ins Perfusat
   $E_t = P \times C_p$ in nmol/g/min
3. der Durchfluß D mit Hilfe der Pulsmarkierung (siehe 3.3.1.1.): $D = I \times R$ in nmol/g/min
4. die Aufnahme $A = I - D$ in nmol/g/min
5. ein zellulärer Efflux $E = E_t - D$ in nmol/g/min
6. die Lebermenge L als Differenz von infundierter und abgegebener BSP·SG-Menge:
   $L(t) = \int_0^t I\,dt - \int_0^t (S+E_t)\,dt$ in nmol/g
7. die Geschwindigkeitskonstanten der Radioaktivitätsabgabe in Galle und Perfusat k_G bzw. k_P $[min^{-1}]$ (siehe dazu 3.3.3.)

Es bedeuten:

F	der Gallenfluß in µl/g/min
c_G	die Konzentration von BSP·SG in der Galle in mM
P	die Perfusionsgeschwindigkeit in ml/min

I die Infusionsrate in nmol/g/min

R das Verhältnis der Flächen unter der korrigierten Testkurve F_{SG} und der Inulinbezugskurve F_I: F_{SG}/F_I

L(t) die Lebermenge zum Zeitpunkt t

3.3.1.3. Fließgleichgewichtsbedingungen

Ein Fließgleichgewicht in jeder Infusionsphase besteht, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

1. $I = S + E_t$
2. $L = const.$
3. $S = const.$
4. $A = S + E$

In Abb. 11 ist erkennbar, daß die Leberbindung und auch die Sekretionsrate in jeder Infusionsphase konstante Werte erreichen.

3.3.2. Überblick über Aufnahme- und Abgabeparameter

3.3.2.1. Gegenüberstellungen der Parameter nach Calciumentzug und ANIT-Vorbehandlung

Abb. 13A,B veranschaulicht die Kurvenverläufe sämtlicher, in jeder Phase der Infusion von BSP·SG meßbarer Größen (Aufnahme, Sekretion, Efflux und Durchfluß) als Funktion der Infusionsrate; zwei Extremfälle sind gegenübergestellt:

1. zum einen eine Kontrolle mit hoher Aufnahmerate, aber merklicher Sekretionslimitierung bei hohen Infusionsraten. Diese ist nicht immer so stark ausgeprägt wie in diesem Fall; denn die Schwankungsbreiten bei hohen Infusionsraten sind erheblich (siehe Abb. 18A). Die frühe

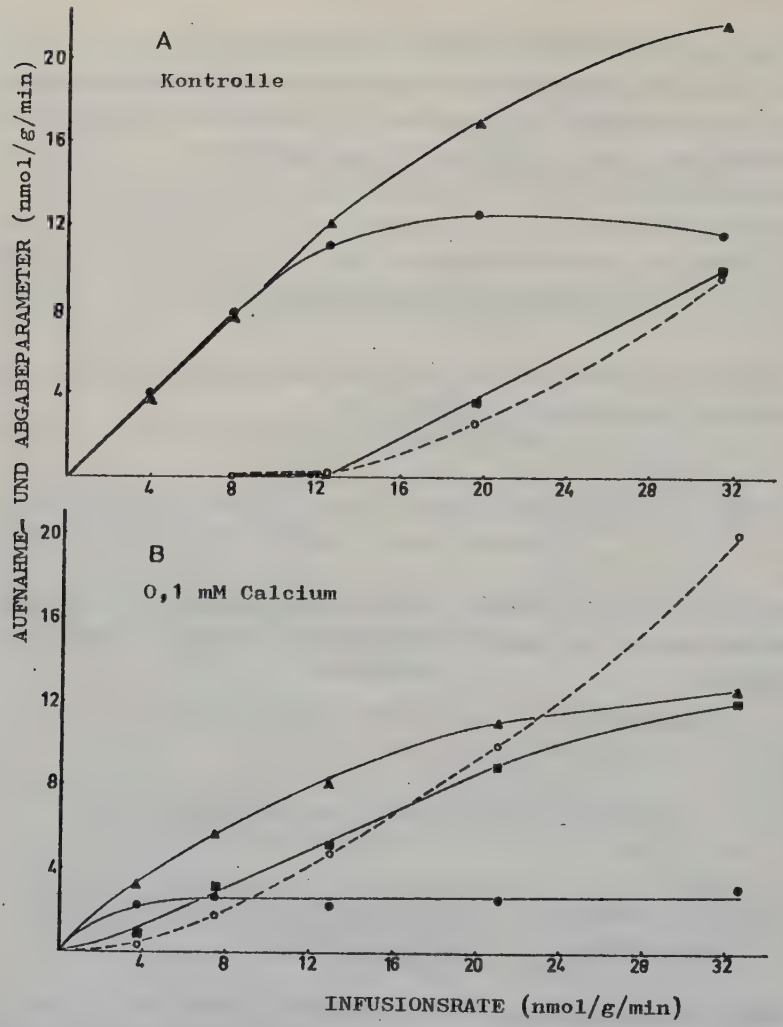


Abb. 13A,B: Aufnahme- und Abgabeparameter von BSP·SG einer Kontroll-Leber (1,25 mM Calcium) (A) und einer Leber unter Dauerperfusion mit 0,1 mM Calcium (B) als Funktion der Infusionsrate.

Versuchsbedingungen siehe Abb. 11. Die aufgeführten Daten wurden im jeweiligen Fließgleichgewicht der fünf Infusionsphasen zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung bestimmt. Die Symbole bedeuten:
▲——▲ Aufnahmerate; ●——● Sekretionsrate;
■——■ Effluxrate; o---o Durchflußrate.
Maximale BSP·SG-Konzentration in der Galle: ca. 12 mM (A); ca. 9 mM (B).

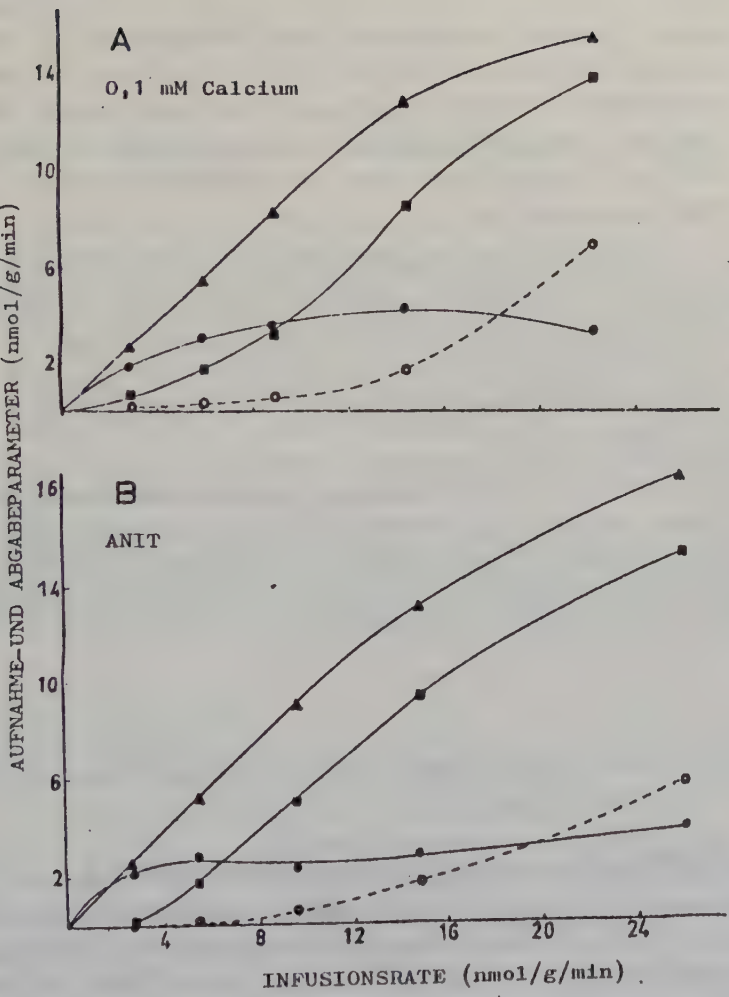


Abb. 14A,B: Aufnahme- und Abgabeparameter von BSP·SG einer zweiten Rattenleber unter Dauerperfusion mit 0,1 mM Calcium (A) und einer Leber 7,5 h nach ANIT-Gabe (B) in Abhängigkeit von der Infusionsrate.
Versuchsbedingungen wie in Abb. 11 beschrieben, Symbole siehe Abb. 13. Maximale BSP·SG-Konzentration in der Galle: ca. 8 mM (A); ca. 9 mM (B).

Sättigung der Sekretion führt zu einem vergleichsweise höheren Efflux.

2. zum anderen eine Leber unter Dauerperfusion mit 0,1 mM Calcium: Sie fällt durch ihre niedrige Aufnahmerate und ihren hohen Durchfluß heraus, ist aber unter diesen Bedingungen auch ein Extremfall (vgl. Abb. 14A). Es stellt sich die Frage, ob hier eine Aufnahmehemmung vorliegt (siehe 3.3.2.2.2.).

Abb. 14A,B verdeutlicht, daß sich eine Leber bei Calciummangel (A) und nach ANIT-Behandlung (B) in ihren Aufnahme- und Abgabeeigenschaften keineswegs unterscheiden müssen. Auch die Gallenflüsse waren sehr ähnlich (nicht gezeigt). Die Unterschiede kommen erst bei der Effluxanalyse zum Ausdruck (siehe 3.3.3.2.).

Auffallend ist in beiden Fällen der hohe Efflux ins Perfusat als Folge der niedrigen Sekretionsrate. Über die Art der "Sekretionshemmung" kann in diesem Zusammenhang noch keine Aussage gemacht werden, weil die Ursache des Effluxes noch unbekannt ist (siehe Einleitung und 3.3.3.).

3.3.2.2. Die Aufnahme unter Calciumentzug und nach ANIT-Behandlung

Die Ermittlung der Aufnahme von BSP·SG ist gekoppelt mit der Frage nach einer möglichen Aufnahmehemmung unter Calciummangel bzw. nach ANIT-Behandlung. Die Schwierigkeit, Maximalgeschwindigkeiten zu bestimmen, liegt im wesentlichen in der hier angewandten Methode begründet:

1. Es gelten keine "Michaelis-Menten"-Bedingungen in dem Sinne, daß ja alle Messungen im Fließgleichgewicht ablaufen und eine Rück"reaktion" mehr oder weniger ausgeprägt stattfindet (Efflux). Letztere ist unter obigen Annahmen ausgeschlossen.

2. Die Berechnung der Aufnahme A = I - D berücksichtigt die Überlagerung mit einem Rückfluß ins Perfusat nur unvollständig.

3.3.2.2.1. Erläuterungen zur Bedeutung eines Rückflusses

Unter Bedingungen, bei denen ein Rückfluß vernachlässigbar ist (niedrige Infusionsraten unter Kontrollbedingungen), kann man in der Leber einen steil fallenden Konzentrationsgradienten vom Ein- bis zum Auslauf annehmen. Dieser wird aber mit zunehmendem Rückfluß ins Perfusat, der selber als ein ansteigender Konzentrationsgradient betrachtet werden muß, flacher (so z.B. unter Calciummangel oder nach ANIT-Behandlung, aber auch bei hohen Infusionsraten unter Kontrollbedingungen (siehe Efflux, Abb. 13, 14)).

Eine Wiederabgabe ans Perfusat muß den Aufnahmeanteil A der Infusion verringern. Abb. 15 soll schematisch veranschaulichen, daß ein Rückfluß von unmarkiertem BSP·SG (RF) die Auf-

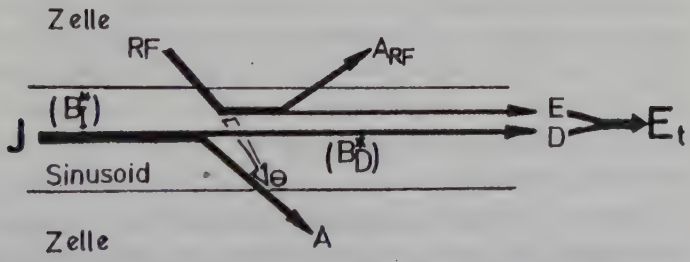


Abb. 15: Skizze zur Veranschaulichung der Kompetitionsphänomene zwischen unmarkiertem und radioaktivem BSP·SG im Fließgleichgewicht in der Leber und ihre Bedeutung für die Aufnahme.

Es bedeutet: I = infundierte Menge; A = Aufnahmeanteil; RF = Rückfluß; A_{RF} = Rückfluß-Efflux; E = Efflux; D = Durchfluß; E_t = effektiver Efflux; B_I^* und B_D^* = infundierte und durchfließende Radioaktivitätsmenge.

nahme der infundierten Radioaktivität (B^*_I) kompetitiv hemmt. Dadurch erhöht sich die durchfließende Radioaktivitätsmenge (B^*_D) und verringert sich die Aufnahme A = I - D. Die tatsächliche Aufnahme A_t setzt sich aus dem errechneten Anteil A und einem wiederaufgenommenen des Rückflusses zusammen (Abb. 15):

$$A_t = A + A_{RF}, \text{ wobei } A_{RF} = RF - E$$

Der Rückfluß RF ist aber aus dem Efflux wegen dessen unbekannten Konzentrationsprofils in der Leber nicht bestimmbar, und damit auch nicht die effektive Aufnahme A_t.

3.3.2.2.2. Aufnahmehemmung

Eine Möglichkeit, Hinweise auf eine Aufnahmehemmung aufgrund einer begrenzten Transportkapazität oder verminderter Bindungsaffinitäten zu erlangen, besteht darin, die durch Rückflußüberlagerung hervorgerufene Hemmung zu "eliminieren" und einen Vergleich mit den Kontrollen anzustellen: Wenn man annimmt, der Aufnahmeanteil A werde bestimmt durch die extrazelluläre Konzentration in der Leber, so sollten sich in der Auftragung A als Funktion der mittleren extrazellulären Konzentration in der Leber $\bar{c}(L)$ [+)] die Kurvenverläufe weitgehend mit denen der Kontrolle decken, es sei denn, andere Hemmechanismen als die eines sich überlagernden Rückflusses sind die Ursache.

In Abb. 16 ist der aufgenommene Anteil A in Prozent der Infusionsrate gegen die mittlere Konzentration $\bar{c}(L)$ aufgetragen: Man erkennt, daß sich die meisten Werte nicht signifi-

---

+) Die mittlere Konzentration $\bar{c}(L)$ ist berechnet aus der Konzentration vor (c_v) und hinter (c_h) der Leber nach: $\bar{c} = (c_v - c_h)/\ln(c_v/c_h)$ (2).

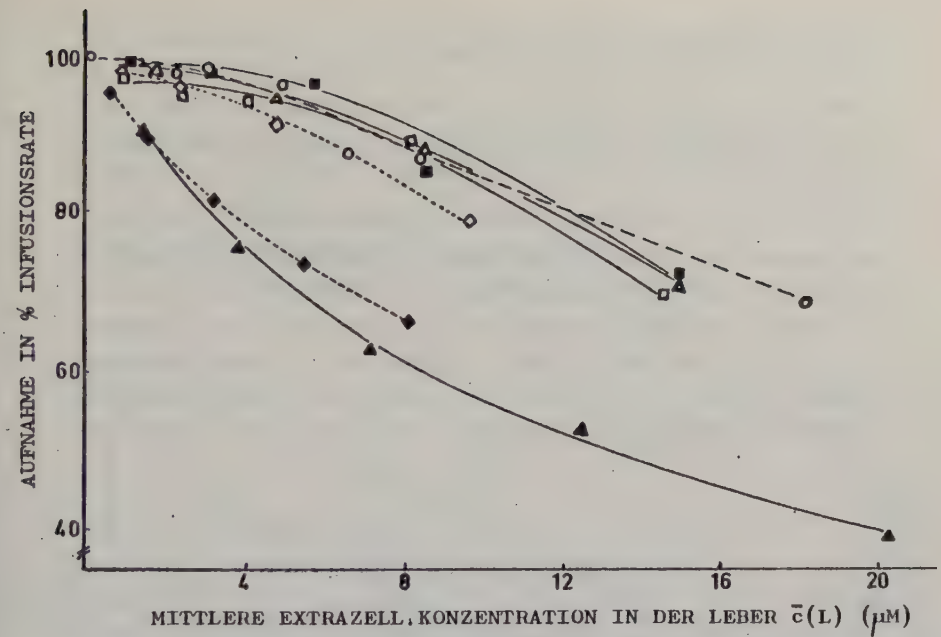


Abb. 16: Aufnahmeraten von BSP·SG (in Prozent der Infusionsraten) in Abhängigkeit von der mittleren extrazellulären Konzentration in der Leber $\bar{c}(L)$ (2).

Versuchsbedingungen siehe Abb. 11. Die Symbole bedeuten: o---o Kontrolle (Mittelwerte aus drei Perfusionen); ■——■ 13,5 h nach ANIT-Gabe; □——□ 7,5 h nach ANIT-Gabe; ◇——◇, ◆——◆ Calciumentzug (6 min): ◇ unter teilweiser Regeneration des Gallenflusses; ▲——▲, Δ——Δ 0,1 mM Calcium-Dauerperfusion.

kant von der Kontrolle (o---o) unterscheiden, daß aber die Abweichungen in zwei Fällen (◆---◆: 6 min Calciumentzug; ▲——▲: 0,1 mM Calcium-Dauerperfusion) nicht mit der kompetitiven Hemmwirkung des Rückflusses zu erklären sind. Hier liegt vermutlich eine andere Ursache vor.

3.3.2.3. Leberbindung von BSP·SG

3.3.2.3.1. Beeinflussung durch Calciumentzug und ANIT-Gabe

In Abb. 17 ist die Leberbindung L in Abhängigkeit von der Infusionsrate jeder Infusionsphase dargestellt, die Kontrolle (o---o) als Mittelwert aus drei Perfusionen.

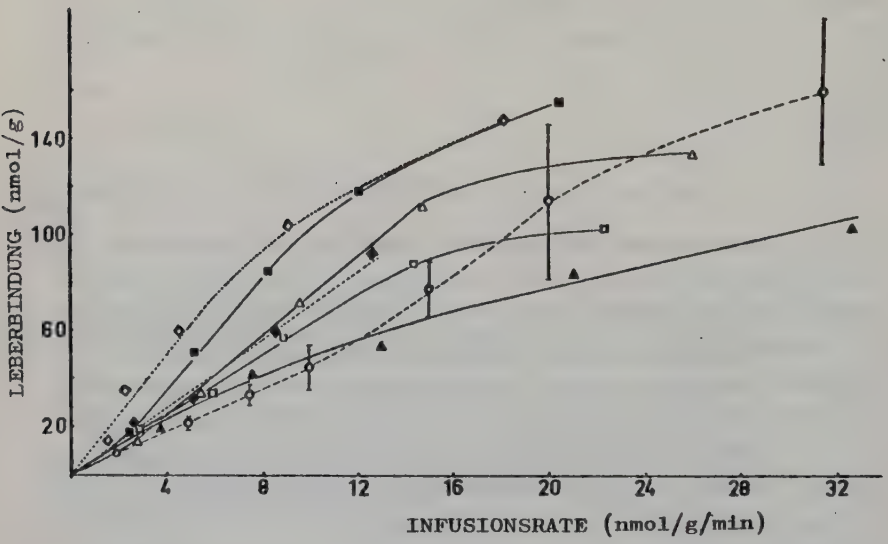


Abb. 17: Beeinflussung der in der Leber gebundenen BSP·SG-Menge durch ANIT-Vorbehandlung und Calciumsenkung. Versuchsbedingungen siehe Abb. 11. Auftragung und Ermittlung der Daten wie in Abb. 13 erläutert; Symbole siehe Abb. 16.

Auffallend ist, daß die Leberwerte der Testbedingungen allgemein vom sigmoiden Kurvenverlauf der Kontrolle abweichen, und zwar in der Weise, daß sie bei niedrigen Infusionsraten (< 12 nmol/g/min) höher als die der Kontrolle liegen.

Dieser sigmoide Anstieg der Kontrollen ist mit einer Sekre-

tionslimitierung zu erklären: Bei niedrigem Sättigungsgrad des Transportsystems auf der Gallenseite bleibt die in der Leber gebundene Menge an BSP·SG gering, während mit zunehmender Sättigung auch die Leberbindung ansteigt und einem Maximalwert zustrebt. Bemerkenswerterweise nimmt gleichzeitig auch der Efflux zu (Abb. 13A).

Das abweichende Verhalten unter den Testbedingungen scheint die Folge des in 3.3.2.2. beschriebenen Rückflusses und des dadurch hervorgerufenen, flachen extrazellulären Konzentrationsgradienten in der Leber zu sein. Folglich bleibt im Fließgleichgewicht ein Teil der Infusion, der unter Kontrollbedingungen über die Galle abfließt, in der Leber gebunden.

3.3.2.3.2. Maximalwerte der Leberbindung

In der Analyse der Calciumentzugs- bzw. ANIT-Wirkung könnte die Betrachtung der Bindungskapazität und Affinität der Leber für BSP·SG bzw. BSP von Bedeutung sein (siehe Diskussion). Die reziproke Auftragung nach Lineweaver und Burk (38) erlaubt nur die Angabe einer Größenordnung für die maximale Leberbindung (nicht dargestellt):
Für die Kontrolle und die zwei oberhalb verlaufenden Kurven (Abb. 17 außer ◆---◆) liegt sie etwa bei 250-260 nmol/g; für die übrigen, die die Kontrollkurve schneiden, bei ca. 160-170 nmol/g.

Die zur Verfügung stehenden Daten vermitteln aber kein klares Bild, wie sich auch schon in den vorangegangenen Abschnitten 3.3.2.1. und 3.3.2.2. herausstellte.

3.3.2.4. Maximale Sekretionsrate

Der Aussagewert von maximalen Sekretionsraten in der Beurteilung der ANIT- bzw. Calciumentzugswirkung ist offensichtlich gering (siehe Abb. 14A,B), zumal ein möglicher Sekretionsanteil am Efflux quantitativ nicht zu erfassen ist.

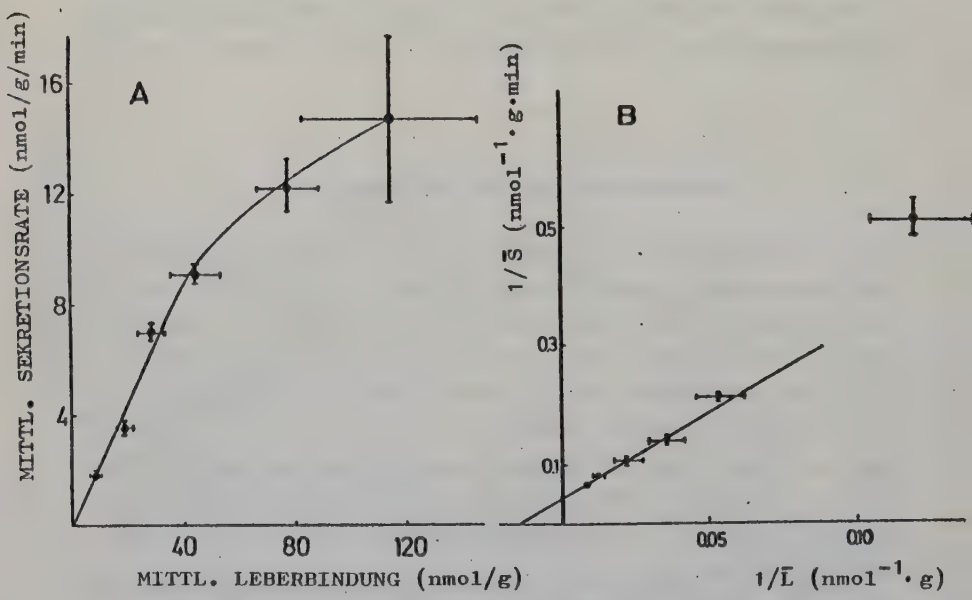


Abb. 18: Mittlere Sekretionsrate $\bar{S}$ von BSP·SG aus drei Kontrollperfusionen als Funktion der mittleren Leberbindung $\bar{L}$ (A) und zugehörige reziproke Auftragung nach Lineweaver und Burk (B) (38).

Die Sekretionsrate S und die Leberbindung L wurden bei konstanter Infusionsrate (sechs ausgewählte Werte) aus den Diagrammen S bzw. L als Funktion der Infusionsrate dreier Kontrollperfusionen abgelesen (siehe dazu Abb. 13A und 17) und die errechneten Mittelwerte $\bar{S}$ bzw. $\bar{L}$ mit zugehöriger Standardabweichung gegeneinander aufgetragen.
Spezielle Daten: maximale Sekretionsrate = 23,0 ± 3,0 nmol/g/min; Michaeliskonstante der Leberbindung = 65,0 ± 11,0 nmol/g.

In Abb. 18A ist der Vollständigkeit halber die mittlere Sekretionsrate $\bar{S}$ als Funktion der mittleren Leberbindung $\bar{L}$ jeweils von drei Kontrollen gezeigt; die Grenzen bedeuten die Standardabweichungen. Aus dem zugehörigen "Lineweaver-Burk"-Diagramm (Abb. 18B) ergeben sich eine maximale mittlere Sekretionsrate $\bar{S}_{max}$ von 23,0 ± 3,0 nmol/g/min und eine mittlere Michaeliskonstante der Leberbindung $\bar{K}_M(L)$ von 65,0 ± 11,0 nmol/g.

3.3.3. Charakterisierung des Effluxes ins Perfusat bei Calciummangel und ANIT-Vorbehandlung

3.3.3.1. Erläuterungen zur Radioaktivitätsverteilung nach Pulsmarkierung im Fließgleichgewicht

Anhand von Abb. 11 soll verdeutlicht werden, wie sich die Radioaktivität der Testsubstanz in jeder Infusionsphase verteilt:

Sie erscheint 1. als Peak in der Galle;

2. als Peak des Durchflusses im Perfusat (erste Kinetik);

3. als ein gewisser Efflux, der sich dem Durchfluß anschließt (zweite Kinetik).

Dieser Efflux wird unter Kontrollbedingungen erst bei hohen Infusionsraten sichtbar (Abb. 13A); aber nach ANIT-Behandlung oder nach Calciummangel - Bedingungen also, die sich durch sehr niedrige oder fehlende Sekretion auszeichnen - erscheint er schon bei viel niedrigeren Infusionsraten (Abb. 13B, 14).

In diesem Kapitel soll versucht werden, eine Antwort zu geben auf die Frage, ob diese Abgabe unter den jeweiligen Eingriffen nun aus der Galle stammt (sezernierter Efflux) oder unmittelbar aus der Zelle (sinusoidaler Efflux).

3.3.3.2. Gegenüberstellung der Radioaktivitätsverteilung in Galle und Perfusat nach ANIT-Behandlung und bei Calciummangel

Einen günstigen Ansatz zur Beurteilung bieten Zustände mit niedriger, aber gut meßbarer Gallesekretion, die schon einen merklichen Efflux ins Perfusat aufweisen. Auf diese Weise lassen sich zeitliche Korrelationen zwischen Efflux und Sekretion herstellen, wie Abb. 19 exemplarisch vorführt: die Radioaktivitätsverteilung einer Infusionsphase wurde jeweils herausgegriffen.

Diese Beispiele der ANIT-behandelten und der einer Dauerperfusion mit 0,1 mM Calcium unterworfenen Leber zeigten hinsichtlich Gallenfluß, Sekretion und Gleichgewichtskonzentrationen im Perfusat ähnliche Eigenschaften.

Nach Subtraktion der ersten Kinetik (Durchfluß o---o) von der zweiten Kinetik[+)] erhält man den Anstieg und das Maximum des Effluxes ins Perfusat. Aus der zeitlichen Korrelation mit dem Verlauf der Radioaktivität in der Galle ist erkennbar, daß das Maximum im Perfusat der Kontrolle und bei Calciummangel vor dem Gallemaximum liegt.

Anders sieht das Bild nach ANIT-Behandlung aus: hier wird schon ohne mathematische Manipulationen das Perfusatmaximum sichtbar. Entscheidend ist, daß es zeitlich mit der Sekretion zusammenfällt.

Am Beispiel einer ANIT-behandelten Leber (8 h nach Gabe, die in diesem Falle keinen Gallenfluß mehr aufwies) sollen die Unterschiede der Perfusateffluxe vor und nach Calciumentzug

---

[+)] Durch Linearisierung der e-Funktionen des Effluxes (Auftragung des Logarithmus der Radioaktivität gegen die Zeit) und Extrapolation der ersten Kinetik auf die Abszisse läßt sich die Differenz zwischen den Meßwerten und den extrapolierten Werten der ersten Kinetik zu jedem Zeitpunkt ermitteln. Die Differenz gibt dann den Verlauf der zweiten Effluxkinetik wieder.

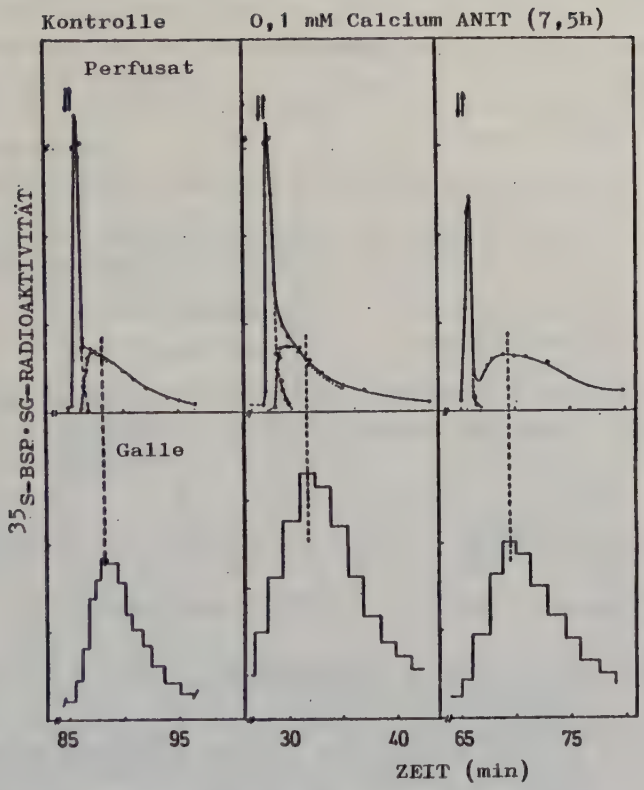


Abb. 19: Beispiel für die Verteilung der ^{35}S-Radioaktivität eines Pulses+) in Perfusat und Galle unter Calciummangel und nach ANIT-Wirkung.

Bedingungen siehe Abb. 11. Gezeigt ist jeweils ein Intervall einer Infusionsphase unter Kontrollbedingungen, während Dauerperfusion mit 0,1 mM Calcium und 7,5 h nach ANIT-Gabe.

+) siehe Fußnote Seite 42.

noch einmal hervorgehoben werden (Abb. 20), wobei ich auf weitere Einzelheiten dieser Abbildung in der Diskussion (4.4.1. und 4.4.2.) eingehen werde.

Während einer offenen Perfusion wurde die Infusion von BSP·SG

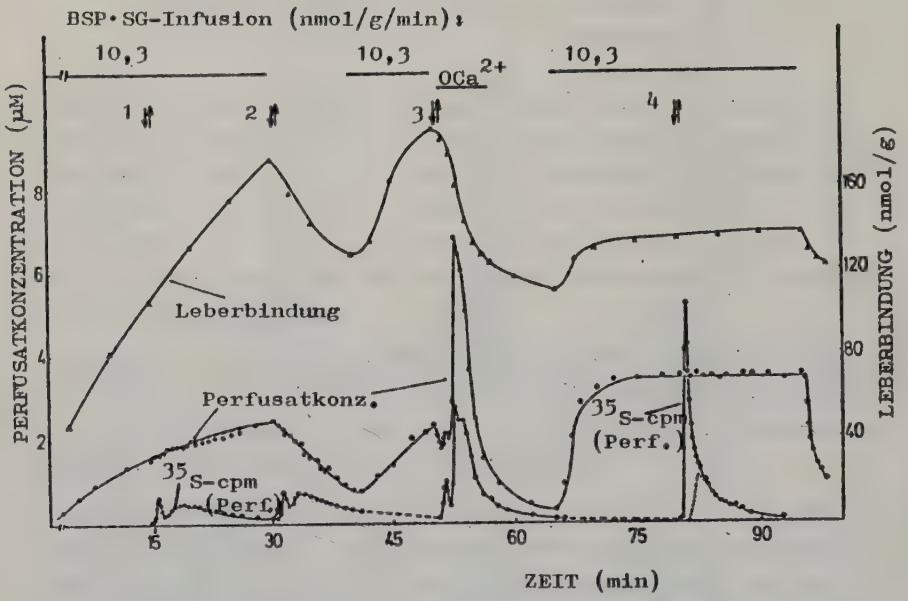


Abb. 20: Wirkung einer calciumfreien Phase auf die BSP·SG-Verteilung in Leber und Perfusat nach ANIT-Vorbehandlung.

Die Operation wurde 8 h nach ANIT-Einwirkung durchgeführt. Die Leber zeigte in diesem Falle keinen Gallenfluß mehr. Vor und nach einer calciumfreien Phase von 6 min wurde jeweils die gleiche Menge BSP·SG infundiert und entsprechend Abb. 11 mit gleichen Mengen an radioaktivem BSP·SG markiert (bezeichnet mit 1 und 4). In Phase 4 wurde der Efflux durch Abzug der ersten Kinetik gemäß 3.3.3.2. berechnet (bezeichnet mit ----). Die Pulse 2 und 3 markieren jeweils den Efflux ins Perfusat nach Absetzen von unmarkiertem BSP·SG vor und bei Calciumentzug (siehe dazu Text und Diskussion).

radioaktiv markiert (Phase 1) und das gleiche noch einmal nach einer Calcium-freien Phase (6 min) wiederholt (Phase 4). Es bietet sich wie in Abb. 19 das gleiche Bild: Nach ANIT-Behandlung vor Calciumentzug ein deutlich vom Durchfluß unterscheidbarer Anstieg im Perfusat mit Maximum; nach Calciumentzug ist letzteres verschwunden; stattdessen wird ein an-

deres, früher liegendes Maximum erst nach mathematischer Berechnung sichtbar. Bemerkenswert ist zudem die starke Zunahme des Durchflusses nach Calciumentzug (Phase 4) (siehe 3.3.2.2.1. und 4.4.1.).

Schlußfolgerungen:
Die bisherigen Ausführungen lassen folgende Schlüsse zu:

1. Im Falle der ANIT-Behandlung muß es sich um einen sezernierten Efflux handeln.
2. Im Falle des Calciummangels ist der Efflux anderer, offensichtlich sinusoidaler Natur.
3. Der entscheidende Calciumentzugseffekt muß früher liegen als der von ANIT, da ja Calciummangel die Wirkung jener Substanz aufhebt.

3.3.3.3. Beurteilung der Perfusateffluxe unter kinetischen Gesichtspunkten

3.3.3.3.1. Kinetisches Verhalten des Radioaktivitätsverlaufs in Galle und Perfusat

Aus Abb. 11 wird deutlich, daß sich die Ausscheidung der Radioaktivität in die Galle unter Kontrollbedingungen (1,25 mM Ca^{2+}) mit zunehmender Infusionsrate, d.h. mit steigender Leberbindung, mehr und mehr verzögert. Die Abnahme während jeder Infusionsphase folgt einer e-Funktion mit abnehmender Geschwindigkeitskonstante (k_G). Letztere ergibt sich bei einem Reaktionsverlauf erster Ordnung aus der Halbwertszeit der Abnahme ($t_{1/2}$) nach:

$$k = \ln 2 / t_{1/2} \quad [min^{-1}]$$

Umgekehrt verhält sich der Efflux der Radioaktivität ins Perfusat (siehe Abb. 11, Infusionsphasen 3, 4, 5): dessen Geschwindigkeitskonstante (k_p) nimmt mit steigender Infu-

sionsrate und Leberbindung zu (siehe auch Abb. 22).

Erklärungsmöglichkeit (Abb.21):

Der verzögerte Abfall der Radioaktivität in der Galle (B_g^*) ist bei steigender Leberbindung die Folge zunehmender Kompetition des kalten BSP·SG (B_i) um die Bindung des radioaktiven (B_i^*) am Carrier (Vorgang 3 = kompetitive Hemmung)+). Damit nimmt die Geschwindigkeitskonstante k_G mit steigender Leberbindung ab. Das gegenläufige Verhalten auf der Sinusoi-

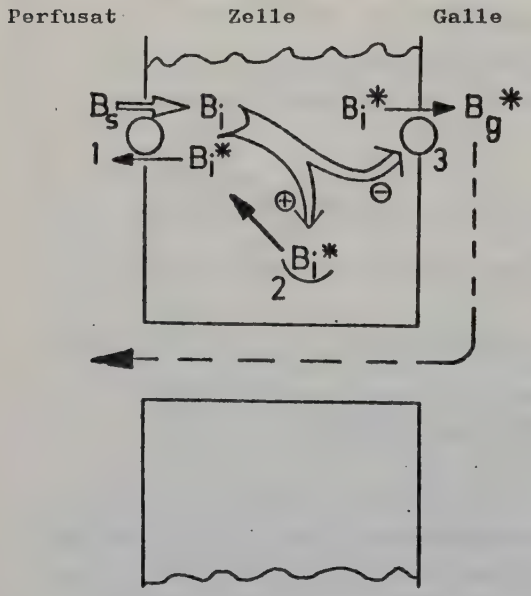


Abb. 21:

Schema zur Erläuterung des unterschiedlichen kinetischen Verhaltens von radioaktivem BSP·SG auf der Sinusoidal- und Gallenseite.

B_s bezeichnet sinusoidales, B_i intrazelluläres und B_g gallenkanalikuläres unmarkiertes BSP·SG; entsprechend symbolisiert * den radioaktiven Marker.

dalseite ist einerseits mit einem Gegentausch (1) und andererseits mit einem Auswaschvorgang (2) vergleichbar - beides Vorgänge, die mit steigendem Angebot des Kompetitors (B_s und B_i in Abb. 21) beschleunigt ablaufen+).

+) Die verzögerte Ausscheidung der Radioaktivität in die Galle spiegelt die Limitierung der Sekretion (Sättigung des Transports) überhaupt wider: diese äußert sich ja 1. in steigender Leberbindung und 2. in einer maximalen BSP·SG-Konzentration in der Galle (Abb. 11). Eine beschleunigte Abgabe auf der Sinusoidalseite zeigt dagegen relativ zur Sekretion eher eine "Nicht-Limitierung" an; eine Sättigung

Eine weitere Möglichkeit ist ein begrenzter Perfusatefflux aus der Galle, wenn die "tight junctions" nicht völlig impermeabel sind. Das Verhalten einer solchen Abgabe werde ich im Zusammenhang mit dem Perfusatefflux an der ANIT-behandelten Leber erörtern (Abb. 22).

3.3.3.3.2. Unterscheidung zwischen sezerniertem und sinusoidalem Efflux aufgrund kinetischer Daten

Abb. 22 und 23 geben die Änderungen der Geschwindigkeitskonstanten der Abgabe in Galle (k_G) und Perfusat (k_P) als Funktion der Leberbindung einerseits und als Funktion der Sekretions- bzw. Effluxrate andererseits wieder: Auffallend ist die steile Änderung der Geschwindigkeitskonstante k_P bei Calciummangel, verglichen mit der nach ANIT-Behandlung bei gleichen Zunahmen in der Leberbindung bzw. Effluxrate.

Zum Verständnis dieses Sachverhaltes kann nun die ANIT-induzierte Cholestase selbst herangezogen werden, gewissermaßen als Referenz: von dieser wissen wir (siehe 3.3.3.2.), daß ihre Ursache im wesentlichen die erhöhte Permeabilität der "tight junctions" bei noch funktionierender Sekretion ist.

Interpretation der kinetischen Daten des sezernierten Effluxes

Im Falle eines sezernierten Effluxes sollte sich die fallende Kinetik in der Galle ins Perfusat fortsetzen. Man findet jedoch einen Anstieg der Geschwindigkeitskonstante k_P (Abb. 22B). Die einzige Erklärung dafür ist die Tatsache, daß sich dem Rückfluß aus der Galle eine Wiederaufnahme überlagert. Das hat zur Folge, daß der als Efflux sichtbar werdende Rest der Sekretion verzögert wird, d.h. die ursprünglichen Geschwindigkeitskonstanten in der Galle (k_G) treten im Perfusat als viel niedrigere Werte in Erscheinung. Daraus folgt: Im Falle eines Gallenrückflusses können die Geschwindigkeitskonstanten im Perfusat nie höher sein als in der Galle. Die

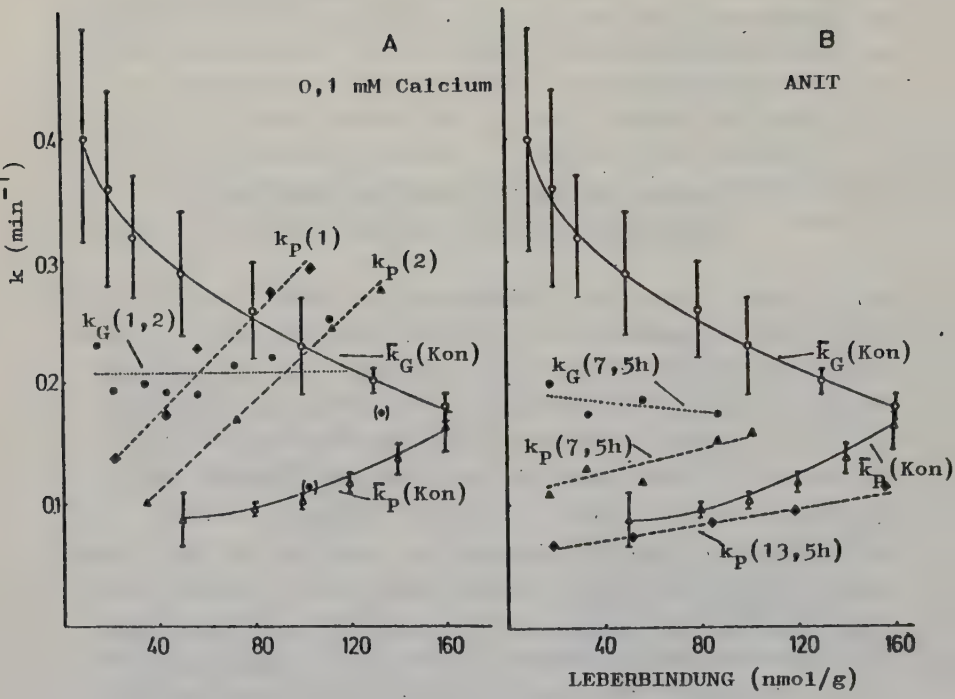


Abb. 22A,B: Änderung der Geschwindigkeitskonstanten der Radioaktivitätsabgabe in Galle (k_G) und Perfusat (k_P) nach Pulsmarkierung mit ^{35}S-BSP·SG mit zunehmender Leberbindung von BSP·SG unter Dauerperfusion mit 0,1 mM Calcium (A) und nach ANIT-Gabe (B).

Versuchsdurchführung entsprechend Abb. 11. k_G und k_P wurden aus den Halbwertszeiten der jeweiligen Radioaktivitätsflüsse in den Infusionsphasen 1-5 berechnet und gegen die zugehörige Leberbindung aufgetragen. $\bar{k}_G$ (o——o) und $\bar{k}_P$ (Δ——Δ) sind die aus drei Kontrollperfusionen berechneten Mittelwerte mit Standardabweichungen: aus den drei Einzeldiagrammen k als Funktion der Leberbindung L wurde bei acht L-Werten k abgelesen und jeweils gemittelt.

Abb. 22A: Es sind die Geschwindigkeitskonstanten von zwei Perfusionen aufgetragen, angezeigt durch (1) und (2). k_G war beidemal in der gleichen Grössenordnung und wurde darum nicht getrennt dargestellt.

Abb. 22B: Die Leber 13,5 h nach ANIT-Gabe wies keinen Gallenfluß mehr auf; demzufolge fehlt k_G

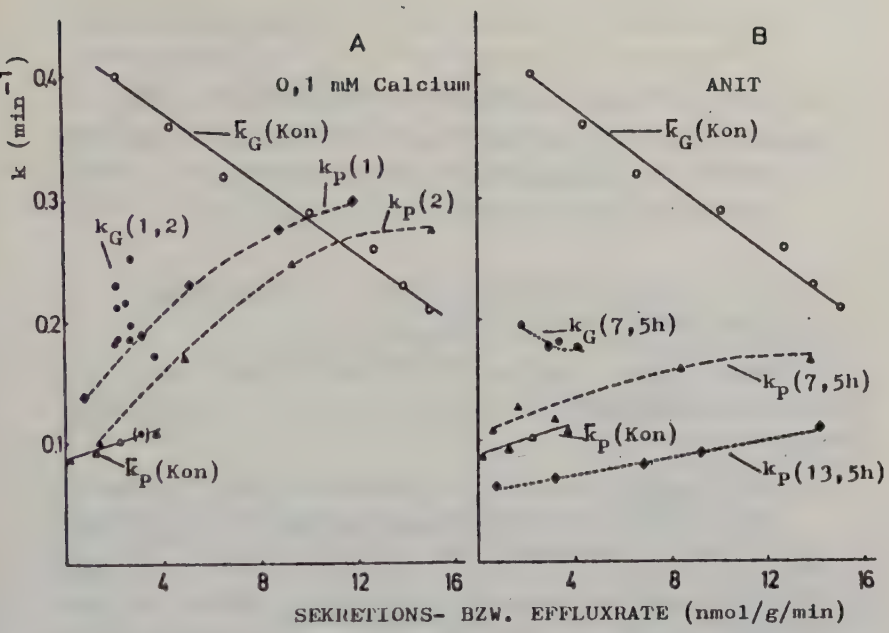


Abb. 23A,B: Änderung von k_G und k_P in Abhängigkeit von der Sekretions- bzw. Effluxrate jeder Infusionsphase unter Dauerperfusion mit 0,1 mM Calcium (A) und nach ANIT-Behandlung (B).

Bedingungen und Daten für k wie in Abb. 22A,B. Die Standardabweichungen der Mittelwerte der Kontrolle sind nicht dargestellt.

positive Änderung im Perfusat kommt nun dadurch zustande, daß mit zunehmender Infusions- und Sekretionsrate der wiederaufgenommene Anteil des Rückflusses immer mehr abnimmt. Folglich wird der Restefflux immer weniger verzögert, was sich in steigender Geschwindigkeitskonstante k_p der Abgabe ins Perfusat äußert.

Schlußfolgerung:

Kennzeichnend für einen sezernierten Efflux von BSP·SG (am Beispiel der ANIT-induzierten Cholestase) ist:

1. ein langsamer[+)] Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten des Effluxes ins Perfusat (k_p) als Funktion der Leberbindung bzw. der Effluxrate (Abb. 22B, 23B);

2. eine Annäherung beider Kinetiken (von Galle und Perfusat): bei reinem sezerniertem Efflux sollten keine Überschneidungen stattfinden.

Deutung der kinetischen Effluxdaten in Calciummangelsituationen (Abb. 22A, 23A, 24)

Im Unterschied zur ANIT-induzierten Cholestase zeigt - wie schon oben angesprochen - der Perfusatefflux folgende Eigenschaften:

1. ein schneller Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten der Radioaktivitätsabgabe ins Perfusat (k_p) als Funktion der Leberbindung und der Effluxrate;

2. Die Kinetik im Perfusat überschneidet die in der Galle zum einen von derselben Leber, zum andern auch von der Kontrolle.

Gemessen an den oben gesetzten Kriterien für den sezernierten Efflux, bestätigt sich, daß der durch Calciumentzug hervorgerufene unabhängig von einer Gallensekretion ist. Verglichen mit der niedrigen Änderung der Geschwindigkeitskonstante des Perfusateffluxes nach ANIT-Behandlung, ist diese hohe Zunahme bei gleichen Änderungen der Effluxrate vereinbar mit dem in Abb. 21 dargestellten kinetischen Modell einer "Nicht-Limitierung" des Auswärtstransports auf der sinusoidalen Seite: diese Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten k_p drückt die Beschleunigung eines galleunabhängigen, sinusoidalen Effluxes aus infolge zunehmender Kompetition mit steigender Infusionsrate.

[+)] Ein langsamer Anstieg von k_p als Funktion der Effluxrate deutet auch auf die Limitierung des Sekretionsvorgangs hin: Eine umso steiler fallende Kinetik in der Galle muß zu einem entsprechend flacheren Anstieg im Perfusat führen.

3.3.4. Langfristige Wirkung von vorübergehendem Calciumentzug

Die erneute Calciumgabe nach vorübergehendem Calciumentzug wirft die Frage nach der Reversibilität des Calciumentzugseffektes auf (siehe Diskussion). Abb. 24 zeigt einen Fall, in dem der Gallenfluß sich langsam erholte (von 0 bis ca.

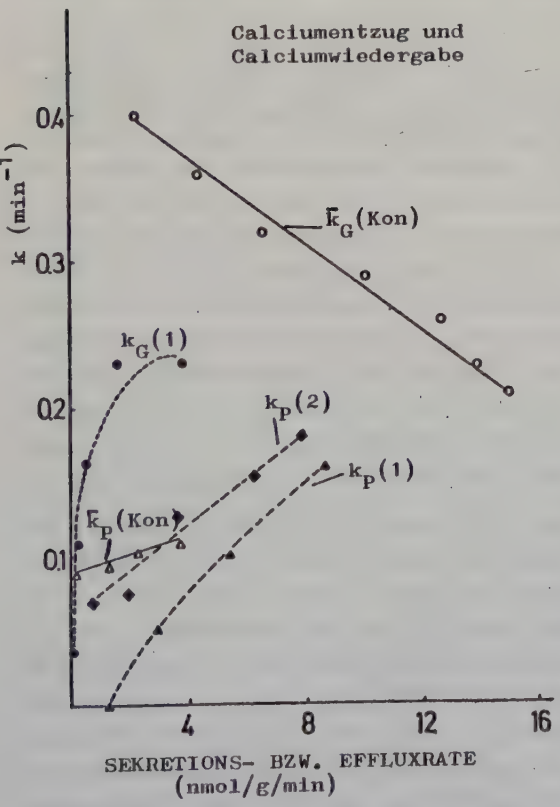


Abb. 24:

Änderung der Geschwindigkeitskonstanten k in Abhängigkeit von der Sekretions- bzw. Effluxrate nach vorübergehendem Calciumentzug.

Zur Erläuterung von k vgl. Text und Abb. 22. Nach einer calciumfreien Phase von 6 min begann 10 min nach erneuter Calciumgabe die Infusion von BSP·SG, wie unter Abb. 11 beschrieben. Die Daten zweier Leberperfusionen, angezeigt durch (1) und (2), sind aufgetragen; Leber (1) - im Gegensatz zu Leber (2) - zeichnete sich durch eine geringe Rückbildung des Gallenflusses aus, wodurch k_G (1) zunimmt. Die Kontrollwerte sind wie in Abb. 23 ohne Standardabweichung dargestellt.

0,5 µl/g/min in 1,5 h; mittlerer Gallenfluß der Kontrollen: ca. 1,2 µl/g/min nach dieser Perfusionszeit). Als Folge dieser Regeneration steigt die Geschwindigkeitskonstante der Radioaktivitätsabnahme in der Galle an.

Im anderen Fall erholte sich der Gallenfluß nicht. Beiden ist aber eine hohe Änderung von k_p gemeinsam, vergleichbar der während Calciumsenkung (Abb. 23A); allerdings liegen sie in der Größenordnung niedriger bei gleichen Effluxraten, so daß die Perfusatkinetik den kinetischen Verlauf in der Galle nicht überschneidet. Um die weitere Annäherung der Perfusat- an die Gallekinetik der Kontrolle beurteilen zu können, muß man offensichtlich höhere Infusionsraten wählen (maximale Infusionsraten in diesen Beispielen: 18 bzw. 13 nmol/g/min).

Es liegt nahe anzunehmen, daß sich einem sinusoidalen ein sezernierter Efflux merklich überlagert. Auch die Zunahme des Gallenflusses in dem einen Fall zeigt, daß eine wenigstens partielle Regeneration möglich ist (siehe Diskussion).

4. DISKUSSION

4.1. Die ANIT-induzierte Cholestase

4.1.1. Schädigung der "tight junctions" und Sekretionshemmung

Die hier dargelegten Befunde sind mit schon früher beschriebenen, cholestatischen Erscheinungen durchaus im Einklang: So schrieben Becker und Plaa (1965) (3), daß sich nach ANIT-Behandlung die Halbwertszeit von konjugiertem Bilirubin im Serum von Mäusen besonders ausgeprägt verlängerte.

Man findet auch die Tatsache erwähnt (6), daß die BSP-Sekretion an der Ratte nach ANIT-Gabe schon zu einem Zeitpunkt abfiel, zu dem der Gallenfluß noch unverändert war (siehe auch 51, S. 224). Woolley et al. (1979) berichteten, daß während der ANIT-induzierten Cholestase an der Ratte der Serumspiegel von Gallenkomponenten (Immunglobulin A, Isoenzymen der 5'-Nucleotidase und konjugiertem Bilirubin) erhöht sei, was auf einen Rückfluß von Galle schließen lasse (70). Letztere Autoren ließen offensichtlich schon anklingen, daß die Sekretion noch unbeeinflußt sein könnte.

Die Versuche dieser Arbeit begründen die Auffassung, daß eine Schädigung der "tight junctions" diese Cholestase verursacht (Typ I-Cholestase) (siehe Einleitung; 3.3.3.2., Abb. 19, 20). Allerdings reichen die hier gesammelten Daten nur zu der Aussage, daß unter den angegebenen Bedingungen die Sekretion bis zu 10 h nach ANIT-Gabe nicht oder nur zu einem geringen Teil gehemmt ist. Längere Einwirkungszeiten fanden unter diesem Gesichtspunkt keine Beachtung, weil dieser Cholestasetyp im wesentlichen der Deutung der Wirkung von extrazellulärem Calciumentzug auf die Sekretion diente.

Eine Möglichkeit, die Frage der Sekretionshemmung durch ANIT anzugehen, wäre, den Perfusatefflux des Radioaktivitätspulses (vgl. Abb. 11, 19; 3.3.1.) bei konstanter BSP-SG-Infu-

sionsrate in Abhängigkeit von der ANIT-Einwirkungszeit (bzw. von der ANIT-Dosis) zu verfolgen. Eine solche Experimentserie müßte natürlich mit Untersuchungen über eine mögliche Beeinflussung der Aufnahme einhergehen, da ja ein sezernierter Rückfluß ins Perfusat immer durch die Wiederaufnahme verändert würde.

4.1.2. Aufnahmehemmung durch ANIT

Die Schwierigkeiten, die Aufnahme mit Hilfe der Radiopulsmarkierung im Fließgleichgewicht zu erfassen, liegen also in einem sich der Infusion überlagernden Rückfluß ins Perfusat und wurden schon unter 3.3.2.2. erläutert. Die Aufnahme ist auf diese Weise nicht zu ermitteln. Nur eine qualitative Aussage läßt sich machen, wenn man den Rückfluß durch Auftragung des Aufnahmeanteils der Infusion gegen die mittlere, extrazelluläre Konzentration in der Leber $\bar{c}(L)$ berücksichtigt (siehe 3.3.2.2.2. Abb. 16). (Wegen der Schwankungen in der Perfusionsgeschwindigkeit (P) und dem Lebergewicht von Perfusion zu Perfusion wäre es exakter, anstatt der mittleren Konzentration $\bar{c}(L)$ die mittlere Infusionsrate $\bar{I}$ als Bezugsgröße zu wählen: $\bar{I}(L) = \bar{c}(L) \times P/g$ Leber; der Fehler ist jedoch gering, da er sich weitgehend herausmittelt, wie die Rechnung zeigt.)

Die Übereinstimmung mit der Kontrolle in Abb. 16 weist darauf hin, daß die Aufnahme von BSP·SG bis zu einer ANIT-Einwirkungsdauer von mindestens 10 h nicht gehemmt ist. Das findet eine Bestätigung in der unveränderten, anfänglichen Aufnahmegeschwindigkeit von unkonjugiertem BSP 16 h nach Gabe des Cholestatikums (nicht gezeigt: siehe aber Abb. 2C, 10 h nach Applikation). Daten zu einem späteren Zeitpunkt standen nicht mehr zur Verfügung.

Diese Ergebnisse sind als vorläufig zu betrachten, weil Konzentrationsabhängigkeiten der anfänglichen Aufnahme von BSP bzw. BSP·SG (und auch Gallensäuren) in Abhängigkeit von der

ANIT-Einwirkungsdauer (bzw. von der ANIT-Dosis) noch fehlen, um Angaben über Maximalwerte machen zu können. Auch in der Literatur sind bisherige Daten wenig hilfreich, weil sich die meisten Autoren auf die Bestimmung von Halbwertszeiten gallengängiger Substanzen im Serum am Ganztier beschränkten (25). Aber eine verlängerte Verweildauer nach der Verteilung im rezirkulierenden System ist kein Maß für eine Aufnahmehemmung wegen der Überlagerung durch einen Rückfluß, wie bereits mehrfach erläutert.

Die Wirkung von ANIT auf die Aufnahme gallengängiger Substanzen läßt sich darum im Perfusionssystem nur studieren:

1. in der Versuchsanordnung, wie unter 2.3.1. beschrieben, wo die anfängliche Aufnahme einer Dosis aus dem rezirkulierenden Perfusionsmedium vor Gleichgewichtseinstellung registriert wird (Abb. 2B,C)
2. mit Hilfe der genaueren, aber etwas aufwendigeren Pulsmethode nach Goresky (17,54)

4.2. Untersuchung mit anderen Cholestatica

ANIT ist eine Substanz ohne medizinische Bedeutung. Es gibt aber eine Vielzahl anderer Fremdstoffe, die als Medikamente in Gebrauch sind und als unerwünschte Nebenwirkung eine Cholestase auslösen können (z.B. Äthinylöstradiol oder Chlorpromazin) (48,51). Forker (1969) (12) verwies schon darauf, daß Östrogene an der Ratte eine Permeabilitätserhöhung hervorriefen. Andere Autoren berichteten Ähnliches u.a. von cholestatisch wirkenden Gallensäuren (37) und von Taurocholsäure (10,36,48).

Die Analyse des Perfusateffluxes im Fließgleichgewicht nach Pulsmarkierung kann sicher einen Beitrag zur Abgrenzung verschiedener intrahepatischer Cholestasetypen leisten, wenn man die Untersuchung in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit oder von der Dosis durchführt.

4.3. Gegenseitige Ergänzung von Elektronenmikroskopie und physiologischen Studien

Die Elektronenmikroskopie bietet die Möglichkeit, feinstrukturelle Unterschiede sichtbar zu machen (41). Die Gefrieräztechnik ("freeze-etching") stellt eine nützliche Ergänzung zu physiologischen Studien dar, vor allem in der Demonstration ultrastruktureller Veränderungen in späteren, fortgeschrittenen Stadien der Cholestase, wohingegen letztere dazu geeignet sind, auch die Frühstadien einer Entwicklung zu erfassen.

4.4. Die Cholestase nach extrazellulärem Calciumentzug

4.4.1. Die erhöhte Permeabilität der "tight junctions" als unbedeutende Begleiterscheinung

In den wenigen Arbeiten, die über den Einfluß von extrazellulärem Calcium auf die Gallesekretion berichten (18,19,45, 67), führen die Autoren den Abfall des Gallenflusses nach Calciumsenkung im allgemeinen auf eine erhöhte Permeabilität der "tight junctions" zurück. So hat Graf (1974) (19) eine gesteigerte transepitheliale Leitfähigkeit zwischen Perfusat und Galle an der perfundierten Rattenleber gemessen, mit der Folge des Ausgleichs einer gallenseitig ursprünglich negativen Potentialdifferenz, und bestätigte die erhöhte Permeabilität der interzellulären Diffusionsschranke mit Hilfe elektronenoptischer Aufnahmen. Sies (1978) (67) registrierte an der perfundierten Rattenleber nach extrazellulärer Calciumsenkung die sprunghafte Abgabe des gallengängigen Glutathionderivates von 2,4-Dinitrochlorbenzol, das in unkonjugierter Form infundiert worden war, und deutete diese Erscheinung als die Folge der Labilisierung der "tight junctions" (mündliche Mitteilung).

In der Tat stellt die erhöhte Durchlässigkeit dieser inter-

membranalen Struktur ein Haupthindernis in der Beurteilung einer möglichen Hemmung des Transports gallengängiger Substrate dar, weil ja ein Rückfluß von Galle ins Perfusat nicht erlaubt, die Sekretion qualitativ und quantitativ zu erfassen.

Eine Antwort hierauf konnte die vergleichende Effluxanalyse geben, die mit Hilfe der radioaktiven Pulsmarkierung eines Fließgleichgewichts durchgeführt wurde (Einzelheiten siehe 3.3.3.). Die Betonung liegt auf dem Vergleich: denn erst die Gegenüberstellung mit der ANIT-induzierten Cholestase (Typ I) belegte endgültig, daß im Falle des Calciummangels der "tight junction"-Effekt zweitrangig ist (siehe dazu 3.2.4., Abb. 9; 3.3.3.2., Abb. 19 und Abb. 20; 3.3.3.3.2., Abb. 22 und 23).

In diesem Zusammenhang sei noch einmal auf die Betrachtung zweier Perfusionen verwiesen (3.3.2., Abb. 13A,B), die eine mit 0,1 mM Calcium, die andere mit 1,25 mM Calcium 7,5 h nach ANIT-Gabe: beides Lebern mit sehr ähnlichen Eigenschaften. Im Gegensatz zur letzteren zeigte jene keinen sezernierten Rückfluß ins Perfusat (Abb. 19). Das sollte man aber gerade aufgrund des bestehenden Konzentrationsgradienten (maximal ca. 8 mM BSP·SG in der Galle) zwischen Galle und Perfusat erwarten, wenn die Permeabilität der "tight junctions" erhöht wäre, wie ja auch im Falle der ANIT-induzierten Cholestase deutlich zu sehen ist. Hieraus muß man schließen, daß die Durchlässigkeit der Interzellularspalte für Gallenkomponenten bei einer extrazellulären Calciumkonzentration von 0,1 mM noch unverändert ist und für den Abfall der Sekretionsrate nicht verantwortlich sein kann.

Die Intaktheit der "tight junctions" bei erniedrigter Calciumkonzentration wurde elektronenmikroskopisch und mit Hilfe von Permeabilitätsstudien (siehe dazu 3.1.2.3.) noch nicht nachgewiesen. Der Beweis ihrer Unversehrtheit bei gleichzeitig abnehmender Sekretionsrate wäre aber wiederum ein überzeugendes Indiz für die Calciumabhängigkeit des Gallesekretionsprozesses.

Eine weitere Besonderheit des Calciumentzugseffekts veranschaulicht Abb. 20: Neben dem Ausbleiben des für ANIT charakteristischen Perfusatmaximums (Phase 4) fällt auf, daß der Durchfluß nach der calciumfreien Phase sehr hoch ist und ein Gleichgewicht sich in der Leber auf niederem, im Perfusat hingegen auf höherem Niveau eingestellt hat. Der Grund dafür kann natürlich in einer tatsächlichen Aufnahmehemmung liegen (siehe unten und 3.3.2.2.2.). Aber auch ein hoher sinusoidaler Rückfluß (der im Perfusat ja als sinusoidaler Efflux sichtbar wird) muß kompetitiv auf die Aufnahme der Radioaktivität wirken und einen hohen Durchfluß hervorrufen (siehe 3.3.2.2.1., Abb. 15).

4.4.2. Wirkung des Calciumentzugs auf Transporteigenschaften

Ein weiteres Argument für eine Sekretionshemmung lieferten jüngst Meldolesi et al. (1978) (40): In ihren elektronenmikroskopischen und physiologischen Versuchen an Pankreaslobuli vom Meerschweinchen stellten sie bei Calciumentzug eine relativ langsam fortschreitende Dissoziation der "tight junctions", aber nach Wiedergabe von Calcium eine sehr schnelle, (fast) reversible Reorganisation dieser Strukturen fest. (Dieses muß allerdings nicht bedeuten, daß sie ihre alten Permeabilitätseigenschaften wiedererlangt hatten (siehe oben 4.3.: Grenzen der Elektronenmikroskopie).) Bemerkenswert vor allem ist, daß diese Autoren eine 60 - 80 %ige Hemmung der Enzymabgabe und der Exozytose trotz Stimulation fanden - sogar noch 2 h nach erneuter Calciumgabe. Morphologisch war außerdem eine Anhäufung von Vakuolen und eine Vergrößerung des Golgiapparates nach Calciummangel zu erkennen.

Auch Versuche anderer Arbeitsgruppen (43) an der isolierten Hypophyse bestätigten, daß calciumfreies Medium die Sekretion von Hormonen hemmte.

Eigene Studien, die eine Hemmung des Transportprozesses an der perfundierten Leber sichtbar machen, fehlen noch. Die Elektronenmikroskopie könnte hier vermutlich noch einen nützlichen Beitrag leisten.

Was eine Aufnahmehemmung angeht, so sind die eigenen, wenigen Daten über Aufnahme und Leberbindung widersprüchlich (siehe 3.3.2.2.2. und 3.3.2.3.). Auf die Schwierigkeiten, jene im Fließgleichgewicht zu messen, habe ich mehrmals hingewiesen (3.3.2.2. und 4.1.2.). In früheren Experimenten entsprechend der Versuchsanordnung nach 2.3.1. und Abb. 2C war nach einem Calciumentzug von 6 min keine Änderung der anfänglichen Aufnahme von BSP und BSP·SG zu bemerken (24). Zu ihrer Bestimmung sind jedoch zusätzliche Kinetiken erforderlich, wie oben bereits erwähnt (4.1.2.).

Die unter 3.3.2.2.2. und Abb. 16 beschriebene Aufnahmehemmung könnte in diesen Einzelfällen mit einer Abnahme der Leberbindungsfähigkeit für BSP·SG einhergehen (siehe 3.3.2.3., Abb. 17). Das intrazelluläre Bindungsprotein für beide Substanzen in der Leber ist die Glutathion-S-transferase (Ligandin) (21,29). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß bei Calciumentzug immer nur ein Teil des gebundenen Substrats sehr schnell abgegeben wurde (siehe Abb. 6). Diese Erscheinung wird besonders in Abb. 9 und 20 deutlich (in diesen Fällen allerdings nach ANIT-Behandlung): Obwohl fast kein Efflux mehr vorhanden ist (Phase 3, Abb. 20), ist die Leberbindung noch beträchtlich. Eine Überschlagsrechnung mit Hilfe der spezifischen Radioaktivitäten in Perfusat und Leber ergab, daß tatsächlich nur der schnell abgegebene Anteil des gebundenen BSP·SG durchmarkiert worden war.

4.4.3. Mögliche Angriffspunkte des Calciumions bei der Gallebildung

4.4.3.1. Leberbindung gallengängiger Substanzen

Dieser vorläufige Befund einer heterogenen Verteilung gallengängiger Substanzen in der Leber deckt sich mit einem von Kroker et al. (1978) vorgestellten Kompartimentierungsmodell der Leber hinsichtlich der Gallensäuren (35). Im vorliegenden Fall könnte ein Kompartiment das Ligandin sein, dessen Affinität oder auch Kapazität für BSP·SG calciumabhängig sind. Es gilt hierbei aber zu berücksichtigen, daß eine Änderung der Calciumkonzentration auch pH-Verschiebungen nach sich ziehen kann, so daß es sich in Wirklichkeit um eine pH-Abhängigkeit handelt (58).

4.4.3.2. Exozytotische Vorgänge

In einer Vielzahl von Veröffentlichungen heben die Autoren die Bedeutung der Exozytose auch für die Gallebildung hervor, zumal sie ja in anderen sezernierenden Epithelien weit verbreitet ist (44,53). Zu ihr gehören Vorgänge, wie die Entstehung und Verschmelzung von Vesikeln (8,26,27,66), die Ausbildung eines kontraktilen Systems von Mikrofilamenten (9,42,49,50) und vermutlich auch von Mikrotubuli (47). In diesen verwickelten Abläufen wird der Änderung des intrazellulären Calciumspiegels eine regulatorische Funktion beigemessen, wobei Depolarisationsvorgänge an der Plasmamembran den intrazellulären Calciumspiegel erhöhen (5,44). Solche Regulationsprozesse sollen u.a. auch über eine cAMP- und calciumabhängige Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ablaufen (20,61,69).

Eine Beteiligung der Adenylcyclase bei der Gallesekretion ist bislang noch umstritten: Graf (1974) z.B. postulierte in Anlehnung an andere sekretorische Vorgänge ein Modell, in dem

eine cAMP-abhängige, intrazelluläre Calciumerhöhung die physiologische Antwort auslösen sollte (19). Die Arbeitsgruppe um Erlinger (1978) konnte aber eine allgemeine cAMP-Abhängigkeit nicht bestätigen (52).

Der intrazelluläre Calciumspiegel kann einerseits durch einen Einstrom aus dem Extrazellulärraum erhöht werden (Bsp.: die Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt von Nervenverbindungen), andererseits durch Abgabe aus intrazellulären Speichern (z.B. aus Mitochondrien oder dem sarkoplasmatischen Retikulum des Muskels). Inwieweit nun die Senkung der extrazellulären Calciumkonzentration auf transmembranale Calciumbewegungen und auf den intrazellulären Calciumspiegel an der Leber Einfluß nimmt, ist unbekannt. Rose und Loewenstein (1975/76) (56,57) berichteten sogar über einen aber nicht immer reproduzierbaren Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels in kultivierten Drüsenzellen nach extrazellulärem Calciumentzug. Das Calcium stammte aus den Mitochondrien.

4.4.3.3. Wechselwirkung von Calcium und Plasmamembran

Der nächstliegende Angriffsort für extrazellulären Calciummangel, aber womöglich mit weitreichenden Folgen, ist die Plasmamembran selbst (46,53). Ihre von oberflächengebundenen Calciumionen regulierte Struktur und Konsistenz bestimmen die Eigenschaften membrangebundener Transportsysteme. Ein Verlust extrazellulären Calciums führt zu einer Verringerung der Phospholipidpackungsdichte und zu einer erhöhten lateralen Beweglichkeit von Phospholipiden und auch von membranständigen Proteinen, d.h. zu einer allgemeinen Membranlabilisierung.

Die extrazellulär erhöhte Zahl von negativen Oberflächenladungen, ursprünglich durch Calcium abgeschirmt, führen vermutlich zu einer Teildepolarisation der Zellmembran (7,39).

Verlust der Membranstabilität und Abfall des Membranpotentials sind mit einer gesteigerten Permeabilität z.B. von Ionen und Substraten verbunden (siehe auch Abb. 10: Glutathion). Es ist zu vermuten, daß sich infolge der geänderten Membraneigenschaften sämtliche dynamischen Gleichgewichte über die Plasmamembran neu einstellen. Die Beeinflussung intrazellulärer Strukturen, wie Mikrofilamente und Mikrotubuli (über direkte Zellmembranverbindungen oder auch über intrazelluläre Milieuverschiebungen (pH, Ca^{2+}-, K^{+}- und Na^{+}-Konzentrationen)) ist nicht auszuschließen. Denkbar wäre auch, daß der vielfach postulierte Exozytoseprozeß an einer destabilisierten Zellmembran nicht mehr ablaufen kann.

Die hier angebotene Deutung geht von veränderten Plasmamembraneigenschaften infolge extrazellulären Calciumentzugs als primärer Ursache für die Sekretionshemmung und den hohen sinusoidalen Perfusatefflux von konjugiertem BSP aus (siehe 3.3.3.2. und 3.3.3.3.).

Es scheint erlaubt zu sein, die Sekretionshemmung nicht nur auf BSP zu beschränken, sondern allgemein auf gallengängige Substanzen auszudehnen; denn Taurocholsäure als Modellsubstanz zeigte in früheren Versuchen (23,32) die gleichen Erscheinungen nach Calciumentzug wie BSP (vgl. Abb. 6, 7 und 9). Graf (1974) (19) fand zudem in calciumfreiem Medium eine Abgabe von TCH ans Perfusat nach Cholsäureinfusion, während Sies (1978) über einen sprunghaften Efflux eines anderen Glutathionderivates unter ähnlichen Bedingungen berichtete (siehe oben) (67).

Der hohe sinusoidale Efflux ins Perfusat ist in diesem Sinne ein Zeichen dafür, daß infolge extrazellulären Calciumentzugs die gallengängigen Substrate über die gesamte Zelloberfläche abfließen (Rückdiffusion oder Umkehrung der Aufnahme), womit die Sekretionslimitierung, ein wichtiges Merkmal des gerichteten Transports, aufgehoben wird (vgl. dazu Text 3.3.3.3.1.). Der Verlust der Polarität der Zelle hat so eine Gleichgewichtsverlagerung gallengängiger Substanzen über die Plasmamembran auf die Perfusatseite zur Folge.

4.4.4. Fragen zur Reversibilität der Sekretionshemmung durch extrazellulären Calciumentzug

Im Text (3.3.4.) habe ich auf eine partielle Regenerationsfähigkeit innerhalb der Perfusionsdauer von 1,5 h hingewiesen. Bezeichnend für diese Leber war ein geringer, im Perfusat meßbarer, sezernierter Efflux schon in der ersten Infusionsphase (nicht gezeigt; Einzelheiten zum Versuch siehe 3.3.1., Abb. 11). Vermutlich hatte in diesem Einzelfalle die calciumfreie Periode nicht ausgereicht, um die Sekretion völlig zu hemmen. Es scheint, daß noch geringe (Rest-)Calciummengen oberhalb eines Schwellenwertes genügen, um eine regenerative Potenz aufrechtzuerhalten. So wird z.B. von der isolierten Hypophyse berichtet, daß calciumfreies Medium vielfach erst nach Zugabe von EGTA eine Sekretionshemmung hervorrief (43).

Es ist bisher auch nicht zu entscheiden, ob die partielle Regeneration die ganze Leber oder nur einzelne Leberlappen betrifft. In der Mehrzahl der perfundierten Lebern (calciumfreie Phase 4-6 min) war eine Regeneration innerhalb von 0,5 bis 1,5 h nach Wiedergabe von Calcium nicht festzustellen. Sollte eine Regeneration stattfinden, dann im allgemeinen so langsam, daß dieser Vorgang die Überlebenszeit des perfundierten Organs bei weitem überträfe. Diese Vermutung findet eine gute Stütze in den oben bereits erwähnten Studien am Pankreaslobulus, wo selbst 2 h nach Wiedergabe von Calcium die Sekretionshemmung bestehen blieb (trotz Reorganisation der "tight junctions") (40).

4.5. Möglichkeiten der Radiopulsanalyse des Perfusateffluxes an der perfundierten Rattenleber

Wie schon unter 4.2. bemerkt, erlaubt die kinetische Effluxanalyse die Unterscheidung zwischen zwei intrahepatischen Cholestaseformen (Typ I und Typ II: siehe Einleitung).

Es ist die Frage, ob sie in ihrer Interpretation so weit verfeinert werden kann, daß ihre kinetischen Daten auch Auskunft über Ereignisse in der Leber nach Calciumwiedergabe (z.B. im Hinblick auf Regenerationserscheinungen) vermitteln. Meine Arbeit beschränkte sich auf die qualitative Deutung der Änderungen der Geschwindigkeitskonstanten des Radioaktivitätseffluxes ins Perfusat (k_P) im Fließgleichgewicht; es heißt: Eine steile Änderung bedeutet überwiegend sinusoidaler, flacher Anstieg überwiegend sezernierter Efflux ins Perfusat (siehe 3.3.3.3.2.). Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch in der quantitativen Betrachtung dieser Änderungen und vor allem der Größenordnung der Geschwindigkeitskonstanten k_P noch Information über eine Überlagerung beider Effluxanteile vorhanden ist (siehe 3.3.4., Abb. 24).

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1.

Die ANIT-induzierte, intrahepatische Cholestase wurde an der isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber in ihrer zeitlichen Entwicklung beschrieben und mit Hilfe von Permeabilitäts-, elektronenoptischen und kinetischen Untersuchungen umrissen.

Es stellte sich heraus, daß die Ursache in den Frühstadien im wesentlichen eine Permeabilitätserhöhung über die "tight junctions" bei noch funktionierender Sekretion ist (Typ I-Cholestase). Eine quantitative Erfassung der Sekretionsleistung nach ANIT-Behandlung war allerdings nicht möglich.

5.2.

Auch extrazellulärer Calciumentzug steigert die Permeabilität der Interzellularschranke für Gallenkomponenten an der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber.

In einer Gegenüberstellung mit dem intrahepatischen Cholestasetyp I (ANIT) war es jedoch in kinetischen Studien gelungen zu beweisen, daß dieser Mangelzustand zusätzlich eine Sekretionshemmung hervorruft (Typ II-Cholestase).

Die biochemischen Ursachen des Calciummangeleffektes sind bisher noch unbekannt. Die Transporthemmung gallengängiger Substrate ist begleitet von einem hohen, sinusoidalen Efflux der konjugierten Verbindung.

Es wird angenommen, daß extrazellulärer Calciumentzug die polare Struktur der Leberzelle und damit ihre Fähigkeit zum gerichteten Transport stört. Die Folge ist eine ungerichtete Abgabe von Gallenkomponenten über die gesamte Zelloberfläche entweder als Rückdiffusion oder als Umkehrung der Aufnahme. Dieses käme einer Gleichgewichtsverlagerung des Transports auf die Perfusatseite gleich.

Schon kurzzeitiger, extrazellulärer Calciumentzug von 4-6 min reichte bis auf wenige Ausnahmen aus, um die Sekretion über

eine Perfusionsdauer von 0,5 - 1,5 h nach erneuter Calciumgabe irreversibel zu beeinträchtigen. Zu diesem Fragenkomplex sind aber weitere Studien notwendig.

Dieses Ergebnis unterstreicht, daß dem Calciumion auch in Sekretionsprozessen an der Leber - wie schon an anderen Epithelien beschrieben - eine weitgehende, tiefere, bisher noch unbekannte Bedeutung zukommt.

6. ABKÜRZUNGEN

ANIT	α-Naphthylisothiocyanat
BSP	Bromosulfophthalein
BSP·SG	Glutathionkonjugat von BSP
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
EGTA	Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
$NADPH \cdot Na_4$	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert, Tetranatriumsalz

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. BARTOŠEK, J.; GUAITANI, A.; MILLER, L.: Isolated Liver Perfusion and Applications, Raven Press, New York, 1973

2. BASS, L.; KEIDING, S.; WINKLER, K.; TYGSTRUP, N.: Enzymatic elimination of substrates flowing through the intact liver. J. Theor. Biol. 61, 393-409 (1976)

3. BECKER, B.A.; PLAA, G.L.: Quantitative and temporal delineation of various parameters of liver dysfunction due to α-naphthylisothiocyanate, Toxicol. Appl. Pharmacol. 7, 708-718 (1965)

4. BRADLEY, S.E.; HERZ, R.: Permselectivity of biliary canalicular membrane in rats: clearance probe analysis. Am J. Physiol. 235, E570-E576 (1978)

5. CARAFOLI, E.; CLEMENTI, F.; DRABIKOWSKI, W.; MARGRETH, A.: Calciumtransport in Contraction and Secretion, North-Holland Publishing Company, Inc., New York, 1975

6. CLODI, P.H.; STEFENELLI, N.: Gallenfluß, Gallendruck und Bromsulfophthaleinausscheidung bei der experimentellen intrahepatischen Cholestase der Ratte, Z. Ges. Exptl. Med. 142, 1-8 (1967)

7. D'ARRIGO, J.S.: Possible screening of surface charges on crayfish axons by polyvalent metal ions. J. Physiol. (London) 231, 117ff (1973)

8. DOUGLAS, W.W.: Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis-vesiculation sequence. Biochem. Soc. Symp. 39, 1ff (1974)

9. DUBIN, M.; MAURICE, M.; FELDMANN, G.; ERLINGER, S.: Phalloidin-induced cholestasis in the rat: relation to changes in microfilaments. Gastroenterol. 75, 450-455 (1978)

10. ELIAS, E.; BOYER, J.L.: A lobular gradient for hepatocyte junction permeability during physiological changes in bile secretion. J. Clin. Invest. 62, 962 abstr. (1978)

11. ERLINGER, S.; DHUMEAUX, D.P.: Mechanisms and control of secretion of bile water and electrolytes. Gastroenterol. 66, 281-304 (1974)

12. FORKER, E.L.: The effect of estrogen on bile formation in the rat. J. Clin. Invest. 48, 654-663 (1969)

13. FORKER, E.L.: Hepatocellular uptake of inulin, sucrose, and mannitol in rats. Am. J. Physiol. 219, 1568 ff (1970)

14. FORKER, E.L.: Mechanisms of hepatic bile formation. Ann. Rev. Physiol. 39, 323-347 (1977)

15. FORSSMANN, W.G.; ITO, S.; WEIHE, E.; AOKI, A.; DYM, M.; FAWCETT, D.: An improved perfusion fixation method for the male genital tract. Anat. Rec. 188, 307-314 (1977)

16. GORESKY, C.A.: The hepatic uptake and excretion of sulfobromophthalein and bilirubin. Can. Med. Assoc. J. 92, 851-857 (1965)

17. GORESKY, C.A.; BACH, G.G.; NADEAU, B.E.: On the uptake of materials by the intact liver. J. Clin. Invest. 52, 975-1009 (1973)

18. GRAF, J.; KASCHNITZ, R.; KORN, P.; PETERLIK, M.: Dependence of bile formation on calcium. Digestion 8, 113 (1973)

19. GRAF, J.: Some aspects of the role of cyclic AMP and calcium in bile formation: studies in the isolated perfused rat liver, aus: Stimulus-Secretion Coupling in the Gastrointestinal Tract; Hrsg.: R.M. Case, H. Goebell; MTP Press Ltd., St. Leonard's House, Lancaster, England, 1976, pp. 305-330

20. GREENGARD, P.: Phosphorylated proteins as physiological effectors. Science 199, 146-152 (1978)

21. HABIG, W.H.; PABST, M.J.; FLEISCHNER, G.; GATMAITAN, Z.; ARIAS, J.M.; JAKOBY, W.B.: The identity of glutathione-S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3879-3882 (1974)

22. HARISCH, G.; EIKEMEYER, J.; SCHOLE, J.: The glutathione status of the rat liver. Experientia 35, 719-720 (1979)

23. HÖKE, H.: Hemmung des Gallensäuretransports durch extrazellulären Calciumentzug an der perfundierten Rattenleber und ihre Relevanz für die Isolierung und Kultivierung von Leberzellen. Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen, 1978

24. HÖKE, H.; KRELL, H.; PFAFF, E.: Are findings with isolated rat livers after short calcium free perfusion relevant for isolated cells? Arch. Toxicol. 44, 23-30 (1980)

25. INDACOCHEA-REDMOND, N.; PLAA, G.L.: Functional effects of α-naphthylisothiocyanate in various species. Toxicol. Appl. Pharmacol. 19, 71-80 (1971)

26. INGOLA, T.D.; KOSHLAND, D.E., Jr.: The role of calcium in fusion of artificial vesicles. J. Biol. Chem. 253, 3821-3829 (1978)

27. JONES, A.L.; SCHMUCKER, D.L.; MOONEY, J.S.; OCKNER, R.K.; ADLER, R.D.: Alterations in hepatic pericanalicular cytoplasm during enhanced bile secretory activity. Lab. Invest. 40, 512 ff (1979)

28. JONES, R.S.; MEYERS, W.C.: Regulation of hepatic biliary secretion. Ann. Rev. Physiol. 41, 67-82 (1979)

29. KARNISAKA, K.; LISOWSKY, J.; GATMAITAN, Z.; ARIAS, J.M.: Interactions of bilirubin and other ligands with ligandin. Biochemistry 14, 2175-2180 (1975)

30. KLAASSEN, C.D.; ROBERTS, R.J.; PLAA, G.L.: Maximal biliary excretion of bilirubin and sulfobromophthalein during various rates of infusion in rat of different weights and strains. Toxicol. Appl. Pharmacol. 15, 143-151 (1969)

31. KREBS, H.A.; HENSELEIT, K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33-66 (1932)

32. KRELL, H.; HÖKE, H.; PFAFF, E.: Studies on the dependence of bile flow on extracellular calcium. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297, Suppl. R42 (1977)

33. KRELL, H.; HÖKE, H.; PFAFF, E.: Persisting changes in organic anion permeability after calcium-free intervals in liver perfusion. 12.FEBS Meeting, Dresden, Abstr.-Nr. 1382 (1978)

34. KRELL, H.; HÖKE, H.; PFAFF, E.; METZ, J.: Development of intrahepatic cholestasis induced by α-naphthylisocyanate: increased permeability of tight junctions. FALK Symposium 27 (Leberkongreß), Basel: Communications of Liver Cells, Posterabstr. 36 (1979)

35. KROKER, R.; ANWER, M.S.; HEGNER, D.: A compartmental model for hepatic transport of taurocholic acid in isolated perfused rat liver. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 287-293 (1978)

36. LAYDEN, T.J.; ELIAS, E.; BOYER, J.L.: Bile formation in the rat: The role of the paracellular shunt pathway. J. Clin. Invest. 62, 1375-1385 (1978)

37. LAYDEN, T.; STARR, J.: Evidence that taurodeoxycholate induces cholestasis by increasing biliary permeability. J. Clin. Invest. 62, 973 (abstr.) (1978)

38. LINEWEAVER, H.; BURK, D.: The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

39. MAC LAUGHLIN, S.G.A.; SZABO, G.; EISENMAN, G.: Divalent ions and the surface potential of charged phospholipid membranes. J. Gen. Physiol. 58, 667 ff (1971)

40. MELDOLESI, J.; CASTIGLIONI, G.; PARMA, R.; NASSIVERA, N.; DE CAMILLI, P.: Ca^{2+}-dependent disassembly and reassembly of occluding junctions in guinea pig pancreatic acinar cells. J. Cell Biol. 79, 156-172 (1978)

41. METZ, J.; BRESSLER, D.: Reformation of gap and tight junctions in regenerating liver after cholestasis. Cell Tissue Res. 199, 257-270 (1979)

42. MONTESANO, R.; GABBIANI, G.; PERRELET, A.; ORCI, L.: In vivo induction of tight junction proliferation in rat liver. J. Cell Biol. 68, 793-798 (1976)

43. MORIARTY, C.M.: Role of calcium in the regulation of adenohypophysial hormone release. Life Sciences 23, 185-194 (1978)

44. NEWMARK, P.: Pathways to secretion. Nature 281, 629-630 (1979)

45. OWEN, C.A.: Isolated rat liver needs calcium to make bile. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155, 314-317 (1977)

46. PAPHADJAPOULOS, D.; VAIL, W.J.; NEWTON, G.; NIR, S.; JACOBSON, K.; POSTE, G.; LAZO, R.: Studies on membrane fusion. III. The role of calcium-induced phase changes. Biochim. Biophys. Acta 465, 579-598 (1977)

47. PATZELT, C.; LE MARCHAND, Y.; JEANRENAUD, B.: Microtubules and secretion process in liver: possible functional modes, aus: The Liver: Quantitative Aspects of Structure and Function. 2nd Inter. Gstaad Symp.; Hrsg.: R. Preisig, J. Birchner, G. Paumgartner; Aulendorf, Editio Cantor, 457-458 (1976)

48. PETERSEN, R.E.; FUJIMOTO, J.M.: Increased biliary tree permeability produced in rats by hepatoactive agents. J. Pharmacol. Exp. Ther. 202, 732-739 (1977)

49. PHILLIPS, M.J.; ODA, M.: The bile canalicular web (abstr.), Fed. Proc. 33, 626 (1974)

50. PHILLIPS, M.J.; ODA, M.; MAK, E.; FISHER, M.M.; JEEJEEBHOY, K.N.: Microfilament dysfunction as a possible cause of intrahepatic cholestasis. Gastroenterol. 69, 48-58 (1975)

51. PLAA, G.L.; PRIESTLEY, B.G.: Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals, Pharmacol. Reviews 28(3), 207-273 (1977)

52. POUPON, R.E.; DOL, M.-L.; DUMONT, M.; ERLINGER, S.: Evidence against a physiological role of cAMP in choleresis in dogs and rats. Biochem. Pharmacol. 27, 2413-2416 (1978)

53. PUTNEY, J.W.: Role of calcium in the action of agents affecting membrane permeability, aus: Calcium in Drug Action. Hrsg.: G.B. Weiss, Plenum Press, New York, London, 1978, pp. 173-194

54. REICHEN, J.; PAUMGARTNER, G.: Uptake of bile acids by perfused rat liver. Am. J. Physiol. 231, 734-742 (1976)

55. ROBERTS, R.J.; PLAA, G.L.: Alteration of the plasma disappearance and biliary excretion patterns of exogenously administered bilirubin by α-naphthylisothiocyanate. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 155, 330-336 (1967)

56. ROSE, B.; LOEWENSTEIN, W.R.: Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic calcium activity. Nature 254, 250-252 (1975)

57. ROSE, B.; LOEWENSTEIN, W.R.: Permeability of a cell junction and the local cytoplasmic free ionized calcium concentration: a study with aequorin. J. Membrane Biol. 28, 87-119 (1976)

58. ROSE, B.; RICK, R.: Intracellular pH, intracellular free Ca^{2+}, and junctional cell-cell coupling. J. Membrane Biol. 44, 377-415 (1978)

59. SARDINI, D.; BARBI, G.; BASTON, F.; MARZO, A.: Urinary metabolites of bromosulfophthalein in normal rats. Experientia 25, 1250 (1969)

60. SCHANKER, L.S.; HOGBEN, A.M.: Biliary excretion of inulin, sucrose, and mannitol: analysis of bile formation. Am. J. Physiol. 200II, 1087-1090 (1961)

61. SIEGHART, W.; THEOHARIDES, T.C.; ALPER, S.L.; DOUGLAS, W.W.; GREENGARD, P.: Calcium-dependent protein phosphorylation during secretion by exocytosis in the mast cell. Nature 275, 329-330 (1979)

62. SIES, H.; SUMMER, K.H.: Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. Eur. J. Biochem. 57, 503-512 (1975)

63. SIES, H.; WAHLLÄNDER, A.; LINKE, I.; MARKLSTORFER, A.: Glutathione disulfide efflux from liver occurs via excretion into bile. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 359, 1151-1152 (1978)

64. STAIB, W.; SCHOLZ, R.: Stoffwechsel der perfundierten Leber. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1968

65. TIETZE, F.: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Anal. Biochem. 27, 502-522 (1969)

66. VACQUIER, V.D.: Isolated cortical granules: a model system for studying membrane fusion and calcium-mediated exocytosis. J. Supramol. Structur 5, 27 (1976)

67. WAHLLÄNDER, A.; SIES, H.: Glutathione-S-conjugate formation from 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and biliary S-conjugate excretion in the perfused rat liver. Eur. J. Biochem. 96, 441-446 (1979)

68. WHELAN, G.; HOCH, J.; COMBES, B.: A direct assessment of the importance of conjugation for biliary transport of sulfobromophthalein sodium. J. Lab. Clin. Med. 75, 542-557 (1970)

69. WOLLENBERGER, A.; WILL, H.: Protein kinase-catalyzed membrane phosphorylation and its possible relationship to the role of calcium in the adrenergic regulation of cardiac contraction. Life Sciences 22, 1159-1178 (1978)

70. WOOLLEY, J.; MULLOCK, B.M.; HINTON, R.H.: Reflux of biliary components into blood in experimental intrahepatic cholestasis induced in rats by treatment with α-naphthylisothiocyanate. Clinica Chimica Acta 92, 381-386 (1979)

LEBENSLAUF

Am 19. September 1949 wurde ich in Engershausen/Kreis Lübbecke (Westfalen) als Sohn des späteren Kaufmanns und Drukkereibesitzers Erwin Höke und seiner Ehefrau Alice, geb. Schüring, geboren. Von Ostern 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule Preuß. Oldendorf/Kreis Lübbecke, danach von 1960 bis 1968 das Wittekind-Gymnasium in Lübbecke. Dort legte ich Ende Mai 1968 die Reifeprüfung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges ab.

Nach zwei Jahren Bundeswehrzeit (von Oktober 1968 bis Ende September 1970) begann ich im Wintersemester 1970/71 mein Studium der Biochemie an der Universität Tübingen und legte bis März 1973 den zweiten Teil des Vordiploms ab.

Im August 1976 heiratete ich Edeltraud Bareiß, zu jener Zeit Studentin für das Lehramt in Chemie und Biologie.

Im Februar 1978 beendete ich meine Diplomarbeit über das Thema: "Hemmung des Gallensäuretransports durch extrazellulären Calciumentzug an der perfundierten Rattenleber und ihre Relevanz für die Isolierung und Kultivierung von Leberzellen". Den die Kultivierung von Leberzellen betreffenden Versuchsteil führte ich unter Leitung von Prof. Dr. Mecke (Institut für Physiologische Chemie), die Experimente an der Rattenleber unter Leitung von Dr. E. Pfaff (Institut für Toxikologie, Direktor: Prof. H. Remmer) durch.

Von Februar 1978 bis Februar 1980 arbeitete ich in derselben Abteilung dieses Institutes unter Leitung von Prof. Dr. E. Pfaff an meiner Dissertation über das Thema: "Die perfundierte Rattenleber als Cholestasemodell: Vergleich der intrahepatischen Cholestase nach α-Naphthylisothiocyanat (ANIT)-Behandlung und durch Calciumentzug".

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

E. Bayer, F.-W. Bentrup, E. Betz, G. Dähn, U. Feine, K.G. Grell, H. Hagenmaier, E. Kallee, H. Krüger, H.Mauser, D. Mecke, H. Metzner, K. Mörike, E. Müller, E. Pfaff, H. Remmer, W. Rüdorff, G. Weitzel, W. Voelter, H. Zähner.